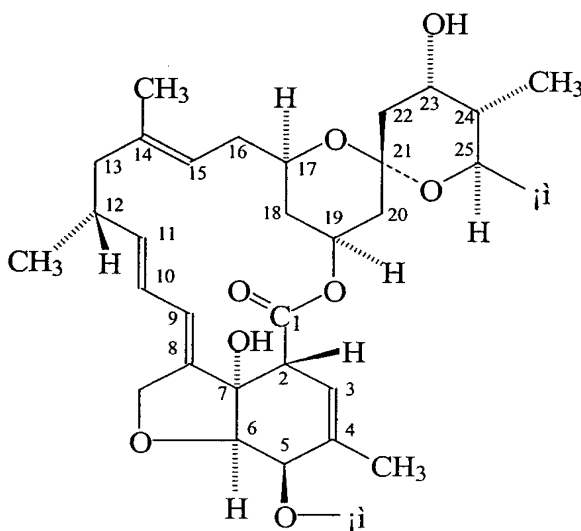


## English Abstract of TW 129660

### Macrolide compounds and their preparation

Compounds as described having the partial formula



These compound may have a 5-OH or -OMe group and at the 25-position an isopropylene group substituted by methyl, ethyl or isopropyl.

The compounds may be used in agriculture or medicine as antiparasitics, and may be prepared by culturing certain Streptomyces strains, in particular Streptomyces thermoarchaensis NC1B 12015.

129660

申請日期	
案號	74104057
分類	

(以上各欄由本局填註)

# 發明專利說明書

一、發明名稱	巨環內酯化合物 (Macrolide compound) 及其製法		
二、發明人	姓名	1 約翰巴利瓦得 John Barrie Ward  2 哈薩馬利諾勃爾 Hazel Mary Noble  3 奈爾波特 Neil Porter  4 理查亞蘭富立頓 Richard Alan Fletton  5 大衛諾勃爾 David Noble  國籍 英國  地址 1 英國哈德福夏布雪波能哈爾路33號 2 英國波克夏斯洛柏罕史通路113 號 3 英國密得塞斯派能喬治第五街111號 4 英國密得塞斯路易斯立普聖艾德蒙斯街12 號 5 英國波克夏斯洛柏罕史通路113 號	
三、申請人	姓名	英商· 格拉斯哥集團有限公司 Glaxo Group Limited  國籍 英國  地址 英國倫敦克拉居斯街克拉居斯宅6 - 12號  代表人姓名 巴利安東尼紐山姆 Barry Anthony Newsam	

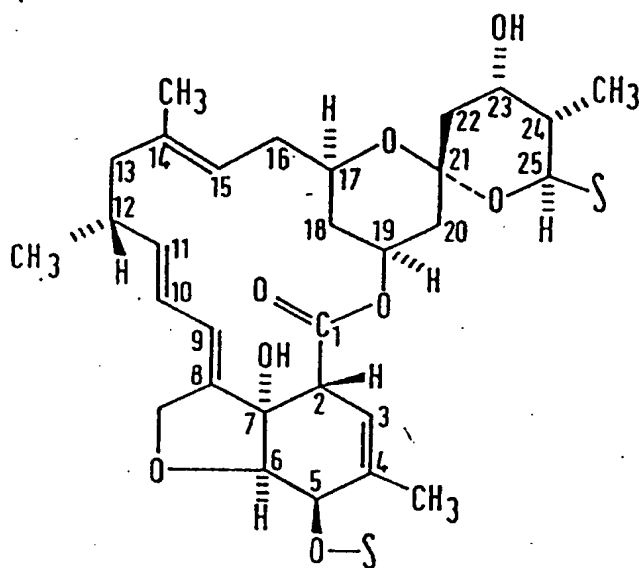
(78年) 1月修正  
補充

發明名稱：巨環內酯化合物 (Macrolide compound) 及其製法

四、摘要說明：

(78年11月修正)

具有部分式 I 結構之化合物之製法：



係由鏈黴菌屬，尤指熱熱鏈黴菌 NCLB 12015 之培養基發酵而得。

此化合物具有 5-OH 或 -OMe 基，在 25 - 位置有被甲基，乙基或異丙基取代之異丙基。

本化合物可殺寄生蟲，做為醫藥或農藥。

1984 年 9 月 14 日在英國申請專利第 8423278 號

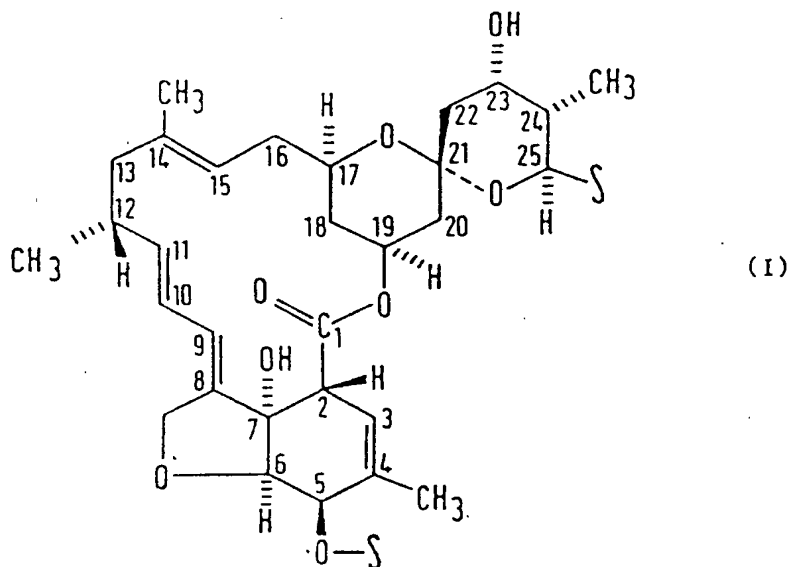
1984 年 12 月 21 日在英國申請專利第 8432519 號

## 五、詳細說明：

本發明乃有關新穎抗生素及其製法。尤其有關可由鏈黴菌有機體發酵而得之抗生素化合物。

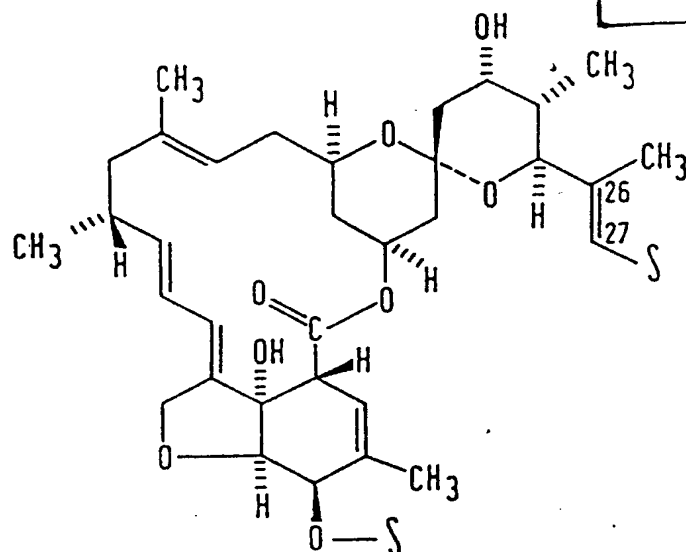
一方面，本發明提供新穎之物質，我們編為抗生素 S541，其係在控制之條件下，由以往未分類過之微生物成長而得。抗生素 S541 具有抗生活性，尤其可撲滅內寄生蟲，外寄生蟲，黴菌，昆蟲，線蟲及壁蟲；因此在農業，園藝，動物及人類之保健方面特別有用。本化合物亦可做為製備其他活性化合物之中間體。本化合物係由發酵而得，可如下述收集實質上純粹之產物。

抗生素 S541 之部分構造式如式 I 所示：



尤其是如式 II 部分構造式所示：

修正  
年月日  
補充



(以上“S”代表非特定基群)

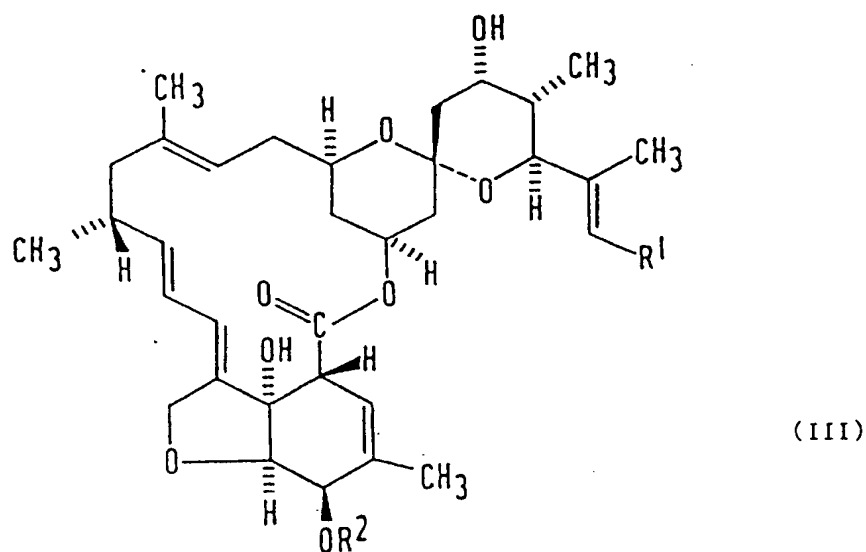
以下將詳細通式如 II 所示之六種化合物。

本發明之化合物具有前述一種構造式或是各種部分構造式之組合。就某些應用，如農業或園藝，獸藥之應用而言，較佳為使用混合之抗生素，亦即不必分離出各別之成分；但就供人類服用之醫藥而言，較佳為使用個別之化合物。本發明亦包含本發明之化合物和至少另一種本發明之化合物之混合物，及實質上呈純粹形式或實質上不含其他巨環內酯化合物之個別化合物。

首先分離出來之抗生素 S541 可如下述在矽膠層析，分離成具有抗生活性之兩種成分，例如具有抗腸蟲活性及在  $254 \times 10^{-9}$  米有紫外線吸收帶者。成分 I 之 Rf 值為 0.70 至 0.75，成分 II 之 Rf 值為 0.39 至 0.46，Rf 值可由莫克 (Merck) 公司矽膠 60 板，以氯仿：醋酸乙酯 (3 : 1) 洗提得之。抗生素 S541 之成分 I 及 II (式中  $R^2$  分別為  $-CH_3$  及  $-H$ ) 均

屬本發明之範圍。

成分 I 及 II 可進一步純製，得六種部分式 I 之化合物，具有抗生素活性，例如抗腸蟲活性。於是本發明之另一目的乃提供通式 III 化合物：



式中  $R^1$  係甲基，乙基或異丙基， $R^2$  係氫或甲基。

所謂的六種化合物定義如下：

化合物 A :  $R^1 =$  異丙基 ,  $R^2 =$  氫 ,

化合物 B:  $R^1 = \text{甲基}$ ,  $R^2 = \text{甲基}$ ,

化合物 C :  $R^1 =$  甲基,  $R^2 =$  氫,

化合物 D :  $R^1 = \text{乙基}$  ,  $R^2 = \text{氫}$  ,

化合物 E :  $R^1 = \text{乙基}$  ,  $R^2 = \text{甲基}$  ,

化合物 F :  $R^1 =$  異丙基,  $R^2 =$  甲基,

其中較佳為化合物 A 及 C。

化合物 B , E 及 F 得自成分 I , 化合物 A , C 及 D 得自成分 II 。

本發明之化合物具有抗生活性，例如抗腸蟲活性，如殺線蟲，尤指抗內寄生蟲及抗外寄生蟲活性。一般而言，本化合物適用於撲滅寄生蟲，如外寄生蟲及內寄生蟲。外寄生蟲及內寄生蟲會侵害人類及各種動物，在農場動物如豬，綿羊，牛，山羊及家禽，馬以及家畜如狗和貓上特別猖獗。若家畜受到寄生蟲感染，會導致貧血，營養不良及體重減輕，為整個世界的經濟變劣的主要原因。

感染動物及／或人類的內寄生蟲有鈎蟲，蛔蟲 ( *Ascaridia* 類， *Ascaris* 類， *Aspicularis* 類 )，仰口線蟲，毛細線蟲，夏倍氏線蟲，古巴毛樣線蟲，畜肺線蟲，血直絲蟲，蟯蟲，扭轉線蟲，鵝盲腸蟲，美洲鈎蟲，細頭毛樣線蟲，長尾線蟲，鼠鈎蟲，管口線蟲，牛胃絲蟲，類蟯蟲，類蛔蟲，圓蟲，擬圓蟲，齧齒動物線蟲，毒蛔蟲，類毒蛔蟲，毛狀圓蟲，類毛狀圓蟲，施毛蟲，鞭蟲及類鈎蟲。

危害動物及／或人類之外寄生蟲有節肢外寄生蟲，如啞血昆蟲，線頭蒼蠅，蚤，蝨，蟎，吮血昆蟲，扁蝨及其他雙翅類害蟲。

危害動物及／或人類的外寄生蟲屬有牛瘤蠅，牛蝨，科羅氏蟲，寇力氏蟲 - 達摩氏蟲，達摩林氏蟲，馬蠅，黑角蠅，馬蝨，吮血蠅，壁蝨，微翅目蝨，青蠅，羊蝨蠅，牛蠅，羊疥蟎，疥恙蟲，牛壁蝨，疥蟲，廐蠅。

本發明之化合物在玻璃體中及活體中證實可撲滅各種內寄生蟲及外寄生蟲。我們已證實本發明化合物特別能消滅寄生線蟲，如反芻獸胃蟲，環狀奧斯特胃蟲，毛狀圓蟲，肺蟲，古巴毛羊線蟲，奧斯特胃蟲，及鼠鉤蟲，及寄生蟎，如疥蟲及癩恙蟲。

因此，本發明化合物可用來治療動物及人類受到內寄生蟲及／或外寄生蟲之感染病。

寄生蟲之種類視宿主及感染區之不同而定。於是例如反芻獸胃蟲，環狀奧斯特胃蟲及毛狀圓蟲通常會感染在綿羊體中，主要寄生在胃及小腸中；而肺蟲，古巴毛樣線蟲及奧斯特胃蟲則通會感染在牛之體中，主要是分別寄生在肺，小腸或胃中。

此外，本發明之化合物經發現知具有抗微生物活性，如對抗假絲黴菌，如白假絲黴菌及團假絲黴菌，以及對抗酵母，如卡爾酵母。

本發明之化合物亦經證實可消滅自由生存之線蟲 (*Caenorhabditis elegans*)。

本發明化合物亦能撲滅在農業，園藝，森林，公共衛生及儲藏產物方面寄生之昆蟲，壁蝨及線蟲，也能對付土壤中及農作物，包含穀類（如小麥，大麥，玉米及稻米），蔬菜（如黃豆），水果（如蘋果，葡萄及柑桔），及根部作物（如甜菜，馬鈴薯）等方面之害蟲。

本發明化合物尤其能消除果實蟎及蚜類，如蚜蟲，瓜葉蟲，桃蚜，浮塵子，辛氏蟲，褐飛蟲，紅蜘蛛，蚤蠅，



銹蟎，小蟲及果蠅屬；線蟲，如葉芽線蟲，球線蟲，異根瘤線蟲，根瘤線蟲及龐納氏線蟲；鱗翅類，如螟蛉，小菜蛾及龐納氏線蟲；穀類象鼻蟲，如安松氏穀象及席托氏穀象；麵粉甲蟲，如擬穀盜蟲；蒼蠅如家蠅；螢蟻；鑽葉蟲；梨蟲；蔥薊馬；蟬螂，如小野蟬螂及蜚蠊，以及蚊子，如熱帶編紋。

依本發明乃提供可做為抗生素之具有部分式 I 構造之化合物。本化合物尤其可用來治療動物及人類的內寄生蟲，外寄生蟲及／或微生物的感染，及做為殺蟲劑，用於農業，園藝或造林，以撲滅昆蟲，壁蟲及線蟲。一般而言，本化合物可施用於宿主（動物或人類或植物或其他蔬菜）或本身或其感染區。<sup>害蟲</sup>特佳的活性化合物為前述之 A，B，C，D，E 及 F。本發明化合物可調配成藥劑，供任何方便的途徑施用，因此本發明亦有關依本發明化合物之藥劑組成物，供動物或人類使用。此種組成物可藉助於一種或多種携體或賦形體，依方便的方式應用。

本發明之組成物特別可供腸外用（包含乳房內使用），口服，直腸，局部或植入使用。配成組成物時，須消毒，例如配成注射劑（包含乳房針劑），眼藥水，藥膏及植入片，活性成分本身製妥後，必須利用  $\gamma$ -射線照射，或曝露於環氧乙烷中殺菌或消毒處理。

依本發明之化合物可配成注射劑，呈單位劑型，裝於安瓿中，或其他單位劑量容器中，或裝於多劑量容器中，必要時，添加防腐劑，做為獸藥或人類之醫藥。此種注射劑可呈在油中或水中之懸浮液，溶液，或乳化液之形式，

其中含有配方劑，如懸浮劑，安定劑，溶解化劑及／或分散劑。或是活性成分呈殺菌過之粉末形式，在使用前，才加入合適的載體，如經殺菌過，無熱原之水。油性載體有多元醇及其酯，如甘油酯，脂肪酸，植物油，如花生油或棉子油，礦物油，如液態石蠟，及油酸乙酯及其他類似的化合物。亦可使用其他載體，如丙二醇。

獸藥組成物亦可配成藥效持久或速效之乳房注射劑，可為消毒過之在水中或油中之溶液或懸浮液。油性載體如前述，其中可含稠化劑或懸浮劑，如軟或硬石蠟，蜂蠟，1, 2 - 羥基硬脂精，氫化蓖麻油，硬脂酸鋁，或甘油單硬脂酸酯。在組成物中可用單獨之通常之非離子，陽離子或陰離子界面活性劑，或其混合物。

本發明化合物亦可配成口服劑，供動物或人類服用，例如配成溶液，糖漿或懸浮液之形式，或是呈乾粉形式，在服用之前才配用水或其他合適載體，任意添加香料或着色料。固態組成物有錠片，膠囊，藥片，藥丸，藥球，粉末，糊體或顆粒。口服用固態及液態組成物可依文獻上已知方法製備之。此等組成物亦可含一種或多種固態或液態之藥理許可之携體及賦形體。用於固態劑型之合適的藥理許可携體包含粘合劑（例如預膠凝化玉米粉，聚乙炔吡咯烷酮或羥丙基甲基纖維素）；填充料（例如乳糖，微晶纖維素或磷酸鈣）；潤滑劑（如硬脂酸鎂，滑石或二氧化矽）；分散劑（如月桂基硫酸鈉或澱粉乙醇酸鈉）；或潤濕劑（如月桂基硫酸鈉）。錠片亦可依文獻上熟知的方法塗覆

之。用於液態劑型之合適藥理許可之添加劑包含懸浮液（如花楸醇糖漿，甲基纖維素或氫化食用脂肪）；乳化劑（如卵磷脂或金合歡）；非水性携體（如杏仁油，油酯或乙醇）；及防腐劑（如對羥苯酸甲酯或丙酯或抗壞血酸）；以及安定化劑及溶解化劑。

口服用之糊劑可依文獻上熟知的方法配製之。糊劑所用之合適之藥理許可添加劑有懸浮劑或膠化劑，例如二硬脂鋁或氫化蓖麻油；分散劑例如聚山梨酸酯，非水性携體例如花生油或油酯；安定化劑及溶解化劑。本發明化合物亦可成獸藥，加入動物每日之固態或液態之飼料中或飲水中。

口含劑可依常製備之呈錠片，糊劑或藥片之形式。

本發明化合物亦可配成藥水，供動物服用，例如使活性成分和藥理許可携體配成溶液，懸浮液或分散液之形式。

本化合物亦可配成栓劑，其中含栓劑基體，供動物或人類使用。

本發明化合物可配成局部用藥，供動物及人類施用，例如調製成軟膏，乳液，洗劑，粉劑，子宮托，灑劑，浸劑，噴劑或滴劑（眼藥水或鼻藥水）。軟膏及乳液可例如由水性或油性基體加上合適的稠化劑及／或膠凝劑而配成。眼用軟膏可採用殺菌過之成分在無菌狀態下配製而得之。

洗劑可呈水性或油性，通常含有一種或多種乳化劑，

安定劑，分散劑，懸浮劑之稠化劑或着色劑。

粉劑可藉助於任何合適的粉末基體配製之。滴劑可呈水性或油性，亦可含有一種或多種分散劑，安定劑，溶解化劑或懸浮劑，其中亦可含有防腐劑。

供吸入用本發明化合物之局部用劑可供動物或人類使用，呈噴劑或吹入劑之形式。

本發明化合物亦可配用其他藥劑活性成分。供動物及人類藥物使用之本化合物每日之劑量為 1 - 2000 微克／公斤體重，較佳為 10 至 1000 微克／公斤，最好是 100 - 500 微克／公斤，每日可分數次，如 1 至 4 次使用。

本發明化合物可依任何方便的方法配成園藝或農業用藥劑，因此本發明包含園藝用或農業用之本化合物組成物。此等配方可呈乾燥型或液型，如撒粉劑（含撒粉劑基體或濃縮物），粉末（包含可溶解或可潤濕粉末），粒劑（包含微粒及可分散顆粒），顆粒，可流動劑，乳化液（如稀乳化劑或可乳化濃縮物），滴劑（如根部滴劑及種子滴劑），種子被覆，種子顆粒，油性濃體，油性溶液，注射劑（如莖部注射劑），洒劑，烟薰劑及噴霧劑。

一般而言，此種配方包含化合物配用合適携體或稀釋劑。携體可呈液態或固態，可用來分散活性化合物供直接應用，或提供配方，供使用者再稀釋成可分散製劑。此等配方為文獻上所熟知，可依常法例如使活性成分混合携體或稀釋劑，如固態携體，溶劑或界面活性劑而得。

用於配方如撒粉劑，顆粒劑及粉末劑之合適固態携體

可選自天然無機填充料，如矽藻土，蒙脫土，葉蠟石或亞塔白土。必要時，高分散性矽酸或高分散性吸收性聚合物可添加在組成物中。顆粒化吸收性携體可呈多孔性（如浮石，碎磚，海泡石或膨潤土），或非多孔性（如方解石或沙）。適用之預顆粒化物質可為有機物或無機物，包含白雲石及研磨過之植物殘渣。

做為携體或稀釋劑之合適溶劑包含芳族烴，脂族烴，醇，二醇或其醚，酯，酮醯胺，強極性溶劑，任意環氧化植物油及水。

在組成物中可添加具有良好乳化分散及／或潤濕性質之常用之非離子性，陽離子性或陰離子性界面活性劑，如羥乙基烷酚及醇，烷苯磺酸鹼金屬或鹼土金屬鹽，木質磺酸或磺琥珀酸或聚酚之磺酸酯單獨或混合物。

必要時，可加入安定劑，抗結塊劑，抗泡沫劑，粘度調節劑，粘合劑及接着劑，光安定劑及肥料，食慾促進劑或其他活性成分於組成物中。本發明化合物亦可配用其他殺蟲劑，殺壁蟲劑及殺線蟲劑。

在配方中，活性成分之濃度通常為約0.01至99%，較佳為0.01%至40%重量。

市售產物通常為濃縮之組成物，使用前，可稀釋至適當之濃度，如活性物質佔0.001至0.0001%重量。

供園藝及農業或動物使用時，不必分離出活性成分，可直接採用整個醱酵液做為活性成分之來源。亦可使用乾燥之醱酵基（含有菌絲），或溶解之菌絲，或利用固態／

液態分離或蒸發技術分離出活的或死的菌絲，或採用分離出菌絲後殘餘之醱酵液。必要時，可將菌絲經加熱殺菌處理，或較佳為乾燥，例如噴霧乾燥或醃筒乾燥。必要時，醱酵基或菌絲可混合前述之常用惰性携體，賦形體或稀釋劑，製得組成物。

由前面的敘述知本發明化合物可用來控制病蟲之感染或蔓延，係對受到感染或群聚之生物，或其存在區施用有效量之一種或多種本發明化合物。

本發明更提供抗生素 S541，或其成分或要素之製法，包含培養能產生至少一種本發明化合物之鏈黴菌屬之有機體，以製得至少一種本化合物，必要時，分離出該化合物。此有機體較佳為主要能製得一種或多種本發明化合物者。

基於生物分類學之研究，特別能產生本物質之微生物為新穎之鏈黴菌屬：訂名為“熱築鏈黴菌”（*Streptomyces thermoarchaensis*），培養在英國，亞柏丁，東麗研究站，國家工業及海運細菌之永遠培養基中，登記號碼為 NCIB 12015。以下將詳述熱築鏈黴菌 NCIB 12015 的形態及培養特性，此有機物及其他抑制鏈黴菌之其他抗生素 S541 均為本發明之另一特性。詳而言之，本發明有關新穎之鏈黴菌品種，其中之黴菌具有實質上和熱築鏈黴菌 NCIB 12015 相同之形態及培養特性。

本發明亦有關能用熱築鏈黴菌醱酵製得之任何化合物及化合物 I 之光學異構物。

鏈微菌屬中較佳者為熱藥鏈微菌 NCIB 12015 或其突變種。

熱藥鏈微菌 NCIB 12015 之突變種可自然形成，可依各種方法，如 H.I. Adler 氏，“工業微生物用之放射及放射同位素”，國際原子能總署，1973年，維也納，第241頁，“微生物的培養技術，所述之方法生產之。此等方法包含離子化放射，化學方法等，例如以 N - 甲基 - N' - 硝基 - N - 亞硝基胍；熱；遺傳技術，如再結合，轉換，變形，溶解化及溶解素轉變及自發突變種之選擇技術。例如我們已培養熱藥鏈微菌 NCIB 12015 之突變種，培養在前述之東麗研究所站中，編號為 NCIB 12111, NCIB 12112, NCIB 12113 及 NCIB 12114。熱藥鏈微菌 NCIB 12111, 12112, 12113 及 12114 及其突變種均屬本發明之範圍中。種 NCIB 12015 在 1984年9月10日沈積，種 NCIB 12114-5 在 1985年6月26日沈積。

突變種 NCIB 12111, 12112 及 12113 係由熱藥鏈微菌 NCIB 12015 芽胞以 NTG 處理，然後以荷力第氏單階法特徵化（參見 R. Holliday 氏，“自然”，178期，1956年，987頁）。

突變種 NCIB 12114 得自熱藥鏈微菌 NCIB 12015 之突變，其特色是可抵抗鏈黴素，亦即在 28℃，曝露於 100 微克／毫升之鏈黴素硫酸酯中 5 天，仍能生存。

由生物分類的研究知熱藥鏈微菌為以前未被發現的新穎微生物，其特徵如下述，實質上如整個品種中所表現者。必須瞭解的是本發明有關於實質上具有類似的特性之任何有機體。

在較佳的芽胞生成介質，如燕麥培養基，麥芽麴培養基及無機鹽酸澱粉培養基培養，（參見 Shirling, E.B. 及 Gottlieb, D. 等氏，“國際系統細菌學期刊”，16期，1966年，303-340頁），可大量成長熱築鏈黴菌 NCIB 12015 能產生安定的酶解菌絲及帶芽胞之空氣菌絲，在主要菌絲上尚有開放式螺旋形側枝。在此等培養基中，反轉着色為黃／褐色，芽胞柄呈灰色。放大100倍觀察知芽胞柄中每鏈含2至5轉，而每轉之螺旋中含5至10個芽胞。平均而言，芽胞柄含有20至50個孢子。放大12,000倍之電子掃描顯微鏡可知芽胞具平滑的壁，是橢圓體，在最寬點之尺寸為  $0.7 \times 1.4$  微米。熱築鏈黴菌 NCIB 12015 為革蘭氏陽性細菌，在  $20^{\circ}\text{C}$  至  $50^{\circ}\text{C}$  之溫度能夠生長並產生芽胞。

由前述數據和 Bergey 氏之“細菌測定手冊”（第八版）中所記載者做比較，知熱築鏈黴菌 NCIB 12015 屬於鏈黴菌屬。

由威廉等氏之電腦化之鑑別矩陣可鑑別熱築鏈黴菌 NCIB 12015 之品種（參考“微生物基因期刊”，1983年，129期 1815-1830頁）。依威廉等氏之41種生物分類試驗法分析熱築鏈黴菌 NCIB 12015 之結果如下：



特 性	結 果
芽胞鏈毛輪	-
芽胞鏈抱刺鉤	-
芽胞鏈直柔性	-
芽胞鏈螺旋	+
菌絲碎裂	-
芽胞表面光滑	+
芽胞表面摺皺	-
芽胞灰色	+
芽胞紅色	-
芽胞綠色	-
逆轉黃／褐色	+
逆轉紅／橙色	-
黑色素產生	-
福壽草醇的使用	-
纖維乙醇之使用	+
D - 果糖之使用	+
非旋光性肌醇之使用	-
木香素之使用	+
甘露糖醇之使用	-
植物蜜糖之使用	+
鼠李糖之使用	+
D - 木糖之使用	+
DL - $\alpha$ - 胺丁酸之使用	-

特 性	結 果
L - 組胺酸之使用	+
L - 羥吡嗪胺酸之使用	-
脲囊素之劣解	+
熊果葉苷之劣解	+
黃嘌呤之劣解	+
果膠之劣解	+
卵磷脂之劣解	-
硝酸鹽還原	+
硫化氫製造	+
疊氮化鈉之容許度 (0.01% 重量/體積)	-
氯化鈉之容許度 (7% 重量/體積)	-
酚之容許度 (0.1%, 重量/體積)	+
在 45°C 生長	+
新黴素抗性 (50 微克/毫升)	-
力范必新素抗性 (50 微克/毫升)	+
黑麴菌 LIV 131 相剋性	+
枯草桿菌 NCIB 3610 相剋性	-
鼠灰鏈黴菌 ISP 5091 相剋性	+

本微生物經鑑別並不屬於 23 種主要菌種中之任一種 (Williams, S.T. 等氏, “微生物基因期刊”, 1983 年, 129 期, 1815-1830 頁), 亦不屬於 Williams 氏及其同事所定義之任何少數菌種或單種的菌群 (“微生物基因期刊”

1983 年，129 期 1743-1813 頁)。熱築鏈黴菌 NCIB 12015 之特性亦和已知之鏈黴菌做比較，已知之鏈黴菌記載於 Bergey 氏之“細菌測定手冊”(第八版)；Shirling 及 Gottlieb 氏之 ISP 報告(“國際系統細菌學期刊”，1968 年，18 期，69 - 189 頁；1968 年，18 期，279-392 頁；1969 年，19 期，391-512 頁；1972 年，22 期，265-394 頁)以及“國際系統細菌學期刊”在 1980 年以後所列舉之新菌種。

結果顯示熱築鏈黴菌 NCIB 12015 和以往的鏈黴菌並不相同，因此是一種新穎的鏈黴菌。

突變種 NCIB 12111, 12112, <sup>12113</sup><sub>A</sub> 及 12114 均實質上具有類似熱築鏈黴菌之主要特性。但 NCIB 12111 之生長需有腺嘌呤，NCIB 12112 之生長需有絲胺酸，NCIB 12113 之生長需有組胺酸，NCIB 12114 可抵抗鏈黴素。

能夠產生 S541 抗生素之微生物方便上可用小型試驗偵測之，亦即使試樣加入自由生存之線蟲之懸浮液中，接著檢視線蟲殘存之情形即知。

由合適的鏈黴菌發酵製造抗生素 S541 可依常法進行，即在碳，氮及天然鹽之可同化源之存在下，培育鏈黴菌。

碳，氮及天然鹽之可同化源可由單純或複合之養分提供，碳源通常包含葡萄糖，麥芽糖，澱粉，甘油，糖蜜，糊精，乳糖，蔗糖，果糖，羧酸，胺基酸，甘油酯，醇，烷及植物油。碳源通常佔發酵介質之 0.5 至 10 % 重量。

氮源通常包含黃豆粉，玉米浸液，酒糟，酵母萃，棉子粉，朮，花生粉，麥精，糖蜜，酪朊，胺基酸混合物，氣（氣體或溶液），銨鹽或硝酸鹽。亦可使用朮及其他的醃胺。氮源通常佔醃酵介質重量的 0.1 至 10 %。

可加入培養基中之天然鹽養分包含能產生鈉，鉀，銨，鐵，鎂，鋅，鎳，鈷，錳，鈦，鉻，鈣，銅，鋁，硼，磷酸根，硫酸根，氯及碳酸根離子之常用鹽。

必要時，要常常加入抗泡劑，以控制過量的泡沫。

鏈黴菌之培養通常在 20 至 50 °C，較佳為 25 至 40 °C，最好是 34 °C 左右，而且較宜充氣及攪盪，例如搖晃或攪拌。在培養基中先接種少量的生成芽胞之微生物，為避免成長遲滯，先取少量的培養基接種微生物芽胞，將所得有生長能力之接種物移入醃酵介質中，或較佳為在移入主要醃酵介質之前，再做多次的接種處理。通常在 pH 5.5 至 8.5，較佳為 5.5 至 7.5 會醃酵。

醃酵時間為 2 至 10，例如約 5 天。

可依常用的分離及分離析技術自整個醃酵混合物中分離出含抗生素 S541 及任何成分之物質。本發明之抗生素 S541 主要存在於囊胞之菌絲中，但亦有存在於醃酵溶液；可在澄清化之前或後，自醃酵液中分離。值得注意的是有許多種分離法。

抗生素 S541 可依各種方法分離及離析，例如採用吸收、洗提，沉澱，部份結晶及溶劑萃取，或各種方法之組合。

溶劑萃取，層析及部份結晶最適合用來分離本發明化合物。

發酵後，可依常法收集菌絲，如採取過濾或離心分離。其後，可由菌絲依下列合適的有機溶劑萃取出抗生素：酮，如丙酮，甲乙酮或甲基異丁酮；烴，如己烷；鹵化烴，如氯仿，四氯化碳或二氯甲烷；醇，如甲醇或乙醇；或二醇，如丙-1,2-二醇；或酯，如醋酸甲酯或醋酸乙酯。若菌絲含有足量的水，較佳為使用水溶性溶劑。

一般而言，較佳的採用一次以上的萃取，以獲得最適的產率。較佳為第一次使用水相溶之溶劑，如甲醇或丙酮。移除溶劑後，可得抗生素，為粗萃取物。溶劑萃取物本身又被萃取，必要時，先例如用蒸發濃縮。此時，較佳為採用水不相溶之溶劑，如己烷，氯仿，二氯甲烷或醋酸乙酯或其混合物，並加入足量的水，使抗生素獲致滿意的分離。除去水不相溶相，可得含抗生素 S541 之物質，必要時，可由適當的溶劑，如異丙醇中結晶分離出成分 B。

可依常法純製及／或分離活性成分及／或其他巨環內酯抗生素成分，例如層析（包含高性能液相層析），採用合適的載體，如矽膠，無官能基之巨網狀吸收性樹脂，如交連聚苯乙烯樹脂，例如琥珀<sup>(R)</sup>XAD-2，XAD-4 或 XAD-1180 樹脂（羅姆·哈斯公司）或 S 112 樹脂（Kastell 公司），或有機溶劑相容之交連葡聚糖（Sephadex<sup>(R)</sup> LH20，Pharmacia 英國公司），或在高性能液相層析之場合下，採用逆相載體，如烴結合之矽膠例如 C<sub>18</sub>-結合之矽膠。

載體可呈床形，較佳為充填在圓柱中。若載體為無官能基之巨網形樹脂，如XAD-1180或S112，則可採用有機溶劑如乙腈，和水之混合液為洗提劑。

抗生素在合適溶劑中之溶液，必要時，先濃縮後，才加入矽膠或交連葡聚糖圓柱中。所得圓柱可先經清洗，然後以具有適當極性之溶劑洗提。在交連葡聚糖及矽膠之場合下，可採用醇，如甲醇，烴，如己烷；乙腈；鹵化烴，如氯仿或二氯甲烷；酯，如醋酸乙酯為溶劑。亦可採用此等溶劑之混合液，或和水之混合液。

本發明化合物之洗提及分離／純製可依常法偵測之，例如採用層析，如薄層層析及高性能層析，或利用前述化合物之性質偵測之。

在矽膠層析中，較佳為採用洗提劑如氯仿：醋酸乙酯，較易於使抗生素S541分離出成分Ⅰ及Ⅱ，成分Ⅰ先洗提出來。利用高性能液相層析可由成分Ⅰ分出化合物B，E及F。同樣地，化合物A，C及D可由成分Ⅱ分離出來。或是，化合物B可由化合物E及F由醇如甲醇或異丙醇中結晶析出。含有化合物E及F之母液必要時可進一步純製，例如經矽膠層析，而化合物E及F可用高性能液相層析分離出來。分離出來之化合物可由例如甲醇，異丙醇或甲醇／水混合物中結晶純製之。本發明亦包含結晶形狀之本化合物。

經適當地配合前述步驟，可分離出本發明化合物固體。必須注意的是前述純製步驟之順序及選擇變化很廣。

於是，化合物 B 可呈結晶固體，純度超過 90 %。同樣地，化合物 A，C，D，E 及 F 之純度亦超過 90 %。但產物之純度只要配合應用即可，例如做人類之醫藥時，純度必須至少 90 %，較佳為大於 95 %。供動物，農業或園藝使用時，純度不必高，例如 50 % 或以下即可。

茲以實施例說明本發明，例中薄層層析 (e.l.c) 係採用莫克公司 5735 矽膠 60 板若不另加說明，則以氯仿：醋酸乙酯 (3 : 1) 顯像；圓柱層析 (CCM) 係採用莫克公司的 7734 矽膠 60 (若不另加註明，則為圓柱尺寸為 200 x 4 厘米)，若不另加註明，則以氯仿：醋酸乙酯 3 : 1 洗提。

諸例中之介質 A，B 及 C 定義如下：

介質 A	克 / 升
D - 葡萄糖	15.0
甘油	15.0
黃豆腴	15.0
氯化鈉	3.0
碳酸鈣	1.0

加入蒸餾水至 1 升，在壓熱殺菌劑，以氫氧化鈉水溶液調 pH 值至 7.0。

介質 B	克/升
D - 葡萄糖	2.5
麥芽糊精 MD 30E (Roquette 英國公司)	25.0
豆朮 (英國 Arkady 公司的 Arkasoy <sup>®</sup> 50)	12.5
糖蜜	1.5
磷酸一氫鉀	0.125
碳酸鈣	1.25
3 - (N - 嗎啉) 丙磺酸	21.0

加蒸餾水至 1 升，在壓熱殺菌劑，以 5 N 氫氧化鈉調 pH 為 6.5。

介質 C	克/升
D - 葡萄糖	2.5
麥芽糊精 MD 30E (英國 Roquette 公司)	25.0
豆朮 (Arkasoy <sup>®</sup> 50)	12.5
甜菜糖蜜	1.5
磷酸一氫鉀	0.125
碳酸鈣	1.25
矽酮 1520 (Dow Corning 公司)	0.625

加蒸餾水至 1 升，在殺菌前，調 pH 為 6.5。



## 例 1

使熱蕈鏈黴菌 NCIB 12015 芽胞接種在具有下列成分之斜瓊脂 ( agar slants ) 中：

酵母萃	(Oxoid <sup>(R)</sup> L21)	克/升 0.5
麥芽萃	(Oxoid <sup>(R)</sup> L39)	30.0
黴菌胰	(Oxoid <sup>(R)</sup> L40)	5.0
瓊脂 3 號	(Oxoid <sup>(R)</sup> L13)	15.0

加蒸餾水至 1 升，pH 約 5.4，在 28℃ 孕育 10 天。然後以 6 毫升 10% 甘油溶液覆蓋在此成熟之培養斜面上，刮以消毒過之工具，使芽胞及菌絲鬆弛。取 0.4 毫升之所得芽胞懸浮液，移至消毒過之聚丙烯吸管中，熱封之，儲存在液氮之蒸氣中，直到取出應用為止。

以一支吸管中之內含物接種 10 毫升之介質 A，然後放在搖晃器上，以 250 轉/分鐘之轉速，50 毫米直徑之軌道轉動，於 28℃ 孕育 3 天。以此孕育後之介質依 2% 之用量接種 15 支管及兩個 250 毫升錐瓶（分別裝有 10 及 50 毫升）之介質 B。

使此管子及錐瓶之內含物在 28℃ 孕育 5 天後，分別在真空過濾此培養基，加入和濾液同體積之甲醇，進行囊胞搖晃 30 分鐘。

為測定管子及錐瓶中成長之囊胞萃對抗自由生存線蟲 ( *Caenorhabditis elegans* ) 之活性，收集此等菌絲萃，蒸發至乾固，又以甲醇萃取成 6 毫升濃體，加入交連葡聚糖圓柱 ( 110 × 2.5 厘米 ) 中，以甲醇洗提。收集 10 毫升洗

提份。

將洗提份 21 - 28 例在一起，蒸發，使 156 毫克殘餘油體以氯仿／醋酸乙酯（3：1）萃取，使所得 3 毫升萃取液進行圓柱層析（55 × 2.5 厘米），收集 10 毫升洗提份，以含有螢光指示劑之板進行薄層層析。洗提份 20 至 23，36 至 44 顯示兩個螢光熄滅區，經鑑別為成分 I（ $R_f$  0.70）及成分 II（ $R_f$  0.43）。蒸發洗提份 20 - 23，得 9 毫克成分 I 固體， $\lambda_{max}$  238 nm， $E_1^{1340}$ ， $\lambda_{max}$  245 nm， $E_1^{1350}$ ；及  $\lambda_{max}$  254 nm， $E_1^{1200}$ 。蒸發洗提份 36 至 44，得 11 毫克成分 II 固體  $\lambda_{max}$  238 nm， $E_1^{1440}$ ； $\lambda_{max}$  245 nm， $E_1^{1460}$  及  $\lambda_{max}$  254 nm， $E_1^{1280}$ 。

#### 例 2

使兩個 250 毫升錐瓶各含之 50 毫升介質 A 以例 1 所製備聚丙稀吸管中之熱藥鏈黴菌芽胞懸浮液 0.2 毫升接種。使此錐瓶在搖晃器上，依 250 轉／分鐘，50 毫米直徑之軌道旋轉，於 28℃ 孕育 3 天後，以此兩錐瓶之內含物接種 20 升發酵容器中之 12 升介質 B。孕育 5 天後，收集之，並依例 3 所述之方法處理。

#### 例 3

使如例 2 在 28℃ 孕育 5 天後之發酵液 12 升在 10℃ 進行 4200 轉／分鐘之離心分離 15 分鐘。使囊胞粒和 5 升甲醇混合，在 4℃ 放置 20 小時。過濾菌絲萃，在 40℃ 蒸發，加入 100 毫升丁 - 1 - 醇後，進行共沸蒸餾。以 5 × 200 毫升甲醇處理萃取液，收集萃取液，蒸發至 100 毫升，倒入交連

之葡聚糖圓柱 (112 × 5 厘米) 中。以甲醇洗提，流出 200 毫升後，收集 50 毫升洗提份。將洗提份 40 - 90 倒在一起，蒸發，得 3.85 克殘餘油體。以 77 毫升氯仿／醋酸乙酯 (3 : 1) 萃取殘餘物。過濾後，進行圓柱層析，流出 200 毫升洗提液後，收集約 15 毫升的洗提份。

將含成份 I 之洗提份 124-142 倒在一起，蒸發，得 253 毫克固體，經高性能液相層析 (充填物：Zorbax<sup>®</sup> ODS，尺寸 25 × 2.1 厘米，洗提劑 80 % 乙腈／水) 得 216 毫克純製產物。將含有成分 II 之洗提份 250-320，蒸發，得 602 毫克固體，經高性能液相層析，收集洗提份 124-142 及洗數次之洗提份，得 540 毫克純製產物。

以紫外線光譜在  $243 \times 10^{-9}$  米波長偵測由高性能液相層析圓柱洗提液。乾燥在此波長有吸收峰之部份，並且 (i) 試驗對抗自由生存線蟲之活性及 (ii) 以薄層層析分析。對抗線蟲有效之四個吸收峰亦具有 Rf 值 0.39 至 0.46 或 0.70 至 0.75。

成分 I 具有一吸收峰，Rf 值為 0.70 至 0.75，此吸收峰即來自化合物 B。成分 II 尚有三個吸收峰，Rf 值為 0.39 至 0.46，即屬化合物 A，C 及 D。

在高性能液相層析圓柱注入試樣後，在 260 至 340 毫升洗提份中含化合物 A，薄層層析之 Rf 值為 0.44。注入試樣後，高性能液相層析在 270 至 310 毫升之洗提份中含化合物 B，薄層層析之 Rf 值為 0.72。在 160 至 180 毫升之洗提份中含化合物 C，薄層層析之 Rf 值為 0.4。在 220 至 250

毫升之洗提份中含化合物 D，薄層層析之 Rf 值為 0.42。

以下將進一步說明化合物 A，B，C 及 D 之特性。

#### 例 4

由例 1 之吸管中取出 0.4 毫升熱藥黴菌 NCIB 12015 之芽胞懸浮液，用來接種 250 毫升錐瓶中之 50 毫升介質 A。將錐瓶放在搖晃器上，依 250 轉／分鐘及 50 毫升直徑軌道旋轉，於 28℃ 孕育 4 天，然後取 8 毫升接種兩個 2 升平底燒瓶中之（各含）400 毫升相同介質，在相同條件下處理 3 天後才進行孕育。

使兩錐瓶的內含物用來接種 70 升發酵容器中之 40 升介質 B，其中摻有 0.0625% 體積之矽酮 525（Dow-Corning 公司）。攪盪及充氣進行發酵，使介質中溶解之氧大於氧之飽和量的 20%，矽酮是用來消除泡沫的。10 天後收成，以 15000 轉／分鐘進行離心處理，使培養液澄清。以 5 升水置換上層清液，在 -20℃ 冷凍所收集之 1.4 仟克囊胞。

1 星期後，使凍結之囊胞溶融，懸浮在 15 升甲醇中，緩慢地攪拌 15 小時。過濾懸浮液，以 10 升甲醇再萃取殘餘固體。收集 25 升濾液，以 12 升水稀釋，以 25 升石油醚萃取。30 分鐘後，離心分離兩相。

使下層的甲醇相以 25 升，15 升及 15 升石油醚萃取三次。使所得之 80 升石油醚相通入拭膜蒸發器（Pfaudler<sup>®</sup> 8.8 - 12V - 27，蒸氣壓 0.1 巴，蒸氣溫度 20℃，水蒸氣溫度 127℃）三次進行濃縮，使 8 升濃縮體以 1 仟克硫酸鈉乾燥，進一步在迴轉薄膜蒸發器中於 40℃ 減壓濃縮。使 15

毫升殘餘油體溶於氯仿／醋酸乙酯 3 : 1 體積比混合液中，進行圓柱層析，流出 1,400 毫升後，收集約 40 毫升之洗提份。

收集洗提份 45 - 46，蒸發，得 940 毫升化合物 B（如例 3 所定義），由甲醇中再結晶兩次，最後由硝基甲烷中再結晶。對於結晶做單晶 X - 光線繞射分析，知其為正交，清澈之稜晶， $a = 10.171(3)$ ， $b = 13.317(5)$ ， $c = 25.032(7)\text{\AA}$ ， $v = 3391\text{\AA}^3$ ， $z=4$ ，空間群  $P2_1,2_1,2_1$ ， $D_c=1.18$  克／厘米<sup>3</sup>， $R = 0.053$ ，在繞射儀，以 Cu - K $\alpha$  照射（ $\lambda = 1.54178\text{\AA}$ ），有 2169 獨立的反射（ $\theta \leq 58^\circ$ ）。由 X - 光線所測定之結晶結構如圖 5 所示。

#### 例 5

仿例 4 製備熱蕈鏈黴菌 NCIB 12015 之接種物，孕育 2 天後，接種 70 升醱酵容器中之 40 升介質 B，其中摻有 0.06% 體積的聚丙稀 2000（而非矽酮 525）。加入聚丙稀 2000 之用意是在整個醱酵過程中控制不起泡。在 28℃ 進行醱酵，攪拌，通風，以維持溶解的氧大於飽和量之 30%。醱酵 24 小時後，取 1 升的培養液移入 700 升醱酵容器中的組成如下之 450 升介質：

	克／升
D - 葡萄糖	2.8
麥芽糊精（MD 30E）	27.8
豆腴（Arkaso 50）	13.9
糖蜜	1.7
磷酸一氫鉀	0.14
碳酸鈣	1.39
矽酮 525（Dow Corning 公司）	0.06% 體積

殺菌處理前，調 pH 為 6.5。

在 28℃ 進行發酵，攪盪，充氣，以維持溶解之氧大於飽和量的 20%。必要時，加入聚丙二醇 2000，做為抗泡劑。2 天後，加入硫酸，調 pH 7.2。5 天後收成。

利用離心，使 450 升培養液澄清，除去上層清液，以 20 升水置換。使所收集之 25.5 仟克囊胞在足量的甲醇中（全體積變成 75 升）攪拌 1 小時。過濾懸浮液，以 3 升甲醇再萃取，過濾。收集 87 升濾液，以 40 升水稀釋，以石油醚萃取。30 分鐘後，離心分離兩相，使下層之甲醇相加入 40 升水後，以 30 升石油醚萃取。分離下層，又以 30 升石油醚萃取。收集 85 升石油醚相，通入拭膜蒸發器三次（蒸氣壓 0.1 巴，蒸氣溫度 20℃，水蒸氣溫度 127℃）濃縮之。以 2 仟克硫酸鈉乾燥所得之 9 升濃縮體，在迴轉薄膜蒸發器中，於 40℃ 減壓進一步濃縮。使 130 克殘餘油體溶於氯仿得 190 毫升體積，經圓柱層析（圓柱充填體積 500 毫升，以氯仿洗），流出 1,400 毫升後，收集約 40 毫升的洗提份。

收集洗提份 32 - 46，蒸發得 21.2 克油體。收集洗提份 47 - 93，蒸發，使所得 20.1 克油體積溶於氯仿：醋酸乙酯（3：1）成 50 毫升，經圓柱層析，流出 1,400 毫升後，收集約 40 毫升洗提份。收集洗提份 22 - 36，蒸發，使所得 3.1 克油體加入第一圓柱洗提份 32 - 46 中。使全部油體溶於 4 毫升沸騰甲醇中，然後加入 20 毫升熱丙 - 2 - 醇，放置得 2.57 克結晶之化合物 B。

蒸發取出化合物 B 後之母液，使所得油體溶於等體積

的二氯甲烷，加入莫克<sup>®</sup>矽膠土 60 圓柱（30 × 2.2 厘米，在二氯甲烷中充填，顆粒 70-230 目 ASTM # 7734），以 2 倍床體積之二氯甲烷洗充填床，以兩倍床體積之氯仿之醋酸乙酯（3 : 1）洗提。蒸發洗提液，使所得油體溶於甲醇中，進行高性能液相層析（250 × 20 毫米，相分離公司的吸附球<sup>®</sup> S5-ODS-2）。取 5 毫升試樣泵入圓柱中，以乙腈：水（7 : 3）依下列條件洗提：

時間(分鐘)	流量(毫升/分鐘)
0.00	0.00
1.00	0.00
1.10	30.00
39.90	30.00
40.00	35.00
75.00	35.00

} 注入

高性能液相層析之洗提液以紫外線光譜在  $238 \times 10^{-9}$  米偵測。在 26.3 分鐘收集有吸收峰之洗提份，蒸發得固態化合物 E。在 36.4 分鐘收集有吸收峰之洗提份，蒸發得固態化合物 F。以下將詳述化合物 E 及 F 之特性。

#### 例 6

仿例 2，使 117 小時孕育後收成之醱酵液進行 121 °C 之壓熱處理 1 小時。冷卻至室溫，以磁力攪拌器攪拌，得均勻之囊胞懸浮液。在室溫，取兩份（2 毫升）進行離心（12,000 克力）分離 2 分鐘，傾析上層清液，使殘餘囊胞懸浮在 2 毫升水中，充分攪拌，又在室溫進行離心分離

(12,000 克力) 2 分鐘。傾析上層清液，又以  $2 \times 2$  毫升蒸餾水囊胞。使洗過之囊胞充分地與 2 毫升水或 2 毫升甲醇混合，在室溫放置 1.5 小時，偶而搖盪。又離心分離 (12,000 克力，2 分鐘，室溫) 所得懸浮液，接著以水稀釋上層清液。使水懸浮液中之囊胞再懸浮於水中，接著立即稀釋於水中。各取 10 微升的稀釋液加入含有自由生存線蟲之 200 微升緩衝液中，液含有 6 克/升  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，3 克/升  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ，5 克/升  $\text{NaCl}$  及 0.25 克/升  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，並調至 pH 7.0。4 小時後，檢視線蟲懸浮液，評估試驗混合物之稀釋液抑制 98% 以上之線蟲之活動能力之效果，結果知甲醇萃取液 1 : 5，1 : 25，1 : 250 及 1 : 500 之稀釋液，囊胞懸浮液 1 : 5，1 : 25，1 : 250，1 : 500 之稀釋液，以及水萃取液 1 : 2，1 : 4 及 1 : 8 之稀釋液 10 微升加入 200 微升之線蟲懸浮液中，均能引起此種抑制效果。

#### 例 7

以如例 1 所製之吸管中之熱築鏈黴菌 NCIB 12015 芽胞懸浮液 0.4 毫升接種 250 毫升錐瓶中的 50 毫升介質 A 或介質 B。在迴轉搖晃器中，依 250 轉/分鐘，及 50 毫米直徑軌道旋轉，於  $28^\circ\text{C}$  孕育 2 天。自每一介質中取出 8 毫升接種 2 升平底燒瓶，其中分別含有 400 毫升的相同介質 (A 或 B)。在相同條件下孕育 2 天。

以兩燒瓶之介質 A 接種 70 升發酵器中之 40 升介質 C，另以兩燒瓶之介質 B 接種另一 70 升發酵器中的 40 升介質 C。



在 34 °C 進行醱酵，攪盪並充氣，使溶解之氧大於飽和量的 30 %。經約 24 小時後，加入硫酸水溶液調 pH 為 7.2。必要時，加入聚丙二醇 2000 抗泡劑。5 天後，收穫之。

以兩燒瓶中介質 B 接種之另一 70 升醱酵器中，加入 0.06 % 的砒酮 1520。在 28 °C 進行醱酵，攪盪，充氣，以維持溶解之氧大於飽和量的 30 %。必要時，加入聚丙二醇 2000 做為抗泡劑。24 小時後，取出 9 升培養液倒入 7000 升醱酵器之 450 升介質 C 中。

在 34 °C 進行醱酵，攪盪，充氣，以維持溶解之氧大於飽和量的 30 %。加入聚丙二醇控制發泡，約 24 小時後，加入硫酸水溶液，調 pH 為 7.2。4 天後，收集此等三個 40 升之醱酵液。

將收集所得醱酵培養液進行離心處理（利用 Sharples<sup>®</sup> AS 16 PY，約 120 升／小時）。使離心碗上之殘餘上層清液以水置換。

使收集之 11.65 仟克囊胞在 33 升甲醇中以銀子<sup>®</sup>混合器進行乳化。60 分鐘後，使懸浮液經斜紋布過濾，又使殘留物在 34 升甲醇乳化。40 分鐘後，又過濾。收集兩甲醇萃取液之濾液。

使收集之 53.5 升萃取液 27 升水及 27 升石油醚混合。攪拌 20 分鐘後，利用離心處理（Westfalia MEM 1256）分離兩相。使 70 升低層之甲醇水相和 37 升水及 27 升石油醚混合，攪拌，如前述分離。以 4 升丙酮破解石油醚相中的界面乳化液。然後使 108 升低層甲醇水相和 40 升水及 27 升石油

醚做第三次混合，攪拌，如前述分離，以 4 升丙酮使界面乳化液澄清。

收集 85 升石油醚萃取液，以拭膜蒸發器濃縮（蒸氣壓 0.15 巴，蒸氣溫度 26 °C）。以 2 仟克硫酸鈉乾燥 3 升濃縮體，在 40 °C 進一步減壓蒸發。使 639 克殘餘油體溶於 300 毫升氯仿／醋酸乙酯（3：1 體積比），經玻璃纖維紙過濾並清洗。使 1060 毫升濾液及洗液進行圓柱層析（1500 × 100 毫米直徑），洗提流量 6 升／小時。

收集 8.8 至 13.1 升之間的洗提液，低壓蒸發，得 56.3 克油體；同樣地，取 13.1 升至 24.6 升之洗提液在低壓濃縮，得 153.4 克淡黃色固體。第一洗提份中主要化合物 B，第二洗提份則為化合物 A，B，C 及 D 之混合物。在第二洗提份中之化合物 B 可如前述重覆進行圓柱層析兩次而移除，最後一次採用新鮮之矽膠，條件相同，但流量減至 3 升／小時。

由第二圓柱之 8.8 至 17.6 升之間，可洗提出化合物 A，C 及 D，其中的殘餘化合物 B 可由第三圓柱的 14 至 28 升之間洗提出 A，C 及 D 分離之。收集洗提液，在低壓濃縮得 114 克固體。蒸發由兩圓柱（7.5-8.8 升及 10.3-13.4 升）所收集之洗提液，分別得 10.7 克及 10 克含化合物 B 之油體，和第一圓柱所得之油體倒在一起。

使含化合物 B 之油體溶於 25 毫升沸騰之甲醇中，並和 100 毫升沸騰之丙 - 2 - 醇混合。冷卻至 0 °C，結晶析出化合物 B。過濾，以 200 毫升甲醇洗，冷卻至 - 20 °C，真空

乾燥，得 25.3 克化合物 B。

真空乾燥由第三矽膠圓柱所得之含化合物 A，C 及 D 之固體，直到重量恒定為 87 克，使 20 克此固體溶於 190 毫升甲醇中，以 7 : 3 體積比之乙腈 / 水混合液加至 230 毫升。取 5 毫升溶液在圓柱層析 (250 × 21.2 毫米直徑，充填著吸球<sup>(R)</sup> ODS-2，5 微米顆粒直徑)，以乙腈 / 水 (7:3) 洗提。流量保持為 20 毫升 / 分鐘約 10 秒；然後逐漸地升為 34 毫升 / 分鐘壓 22 分鐘，並保持在該流速 3 分鐘。以  $238 \times 10^{-9}$  米之紫外線偵測洗提出來之化合物，結果知在 11.0 至 13.4 分鐘洗提出化合物 C，在 13.4 至 17.4 分鐘洗提出化合物 D，在 17.4 至 23.0 分鐘洗提出化合物 A。

收集由諸層析所得含化合物 C 之洗提份，減壓濃縮成固體，同樣地含化合物 A 之洗提份亦濃縮成固體。亦收集含化合物 D 之洗提份，濃縮得 7 克不純固體，再溶於 65 毫升甲醇，和 7 : 3 乙腈 / 水混合，如前述在吸球<sup>(R)</sup> ODS2 圓柱中再層析，但流量恒為 20 毫升 / 分鐘。在 16 至 20 分鐘洗提出化合物 D，收集諸洗提份，濃縮得固體。在真空以五氧化二磷分別乾燥含化合物 A，C 及 D 之固體至重量不變，分別得 55 克，7.0 克及 1.21 克。

由本製程所得之四種固體分別具有和確知的化合物 A，B，C 及 D 之性質相似。

#### 例 8

使 250 毫升錐瓶中之 50 毫升介質 B 以如例 1 所製備之吸管中之熱藥鏈黴菌 NCIB 12111, 12112, 12113 及 12114

之芽胞懸浮液 0.5 毫升接種。

使裝在燒瓶之熱築鏈黴菌 NCIB 12111, NCIB 12112 及 NCIB 12113 在迴轉搖晃器中，於 31 °C 進行孕育。使裝在燒瓶之熱築鏈黴菌 NCIB 12114 在 28 °C 孕育 2 天，然後取 2 毫升培養液移至另一 250 毫升錐瓶中之 50 毫升介質 B 中。使此燒瓶在迴轉搖晃器中，於 31 °C 孕育。所有的燒瓶的均依 250 轉 / 分鐘，循 50 毫米直徑軌道搖盪。

4 天孕育後，自每一培養液中取出 10 毫試樣，以 1250 克力離心 45 分鐘，並依下述步驟操作。移除上層清液，使顆粒再懸浮於 10 毫升甲醇中。激烈搖晃懸浮液後，放置 1 小時，偶而混合之。然後以 10,000 克力離心懸浮液 5 分鐘，以高性能液相層析分析 ( S5 ODS-2 , 10 厘米 × 4.6 毫米 , 70 % 乙腈 / 0.1 M 磷酸二氫銨 ) 。在  $265 \times 10^{-9}$  米之波長偵測出吸收峰。

由高性能液相層析，顯示化合物 A , B , C 及 D 分別均有存在。

#### 例 9

化合物 A , B , C , D , E 及 F 經分析知具有下列特性：

(i) 只含碳，氫及氧，

(ii) 化合物 A , B , C , D , E 及 F 經電子衝擊 ( E.I. )

之質譜分析，結果如下：

化合物	分子量	對應之分子式
A	612.37	$C_{36}H_{52}O_8$
B	598.35	$C_{35}H_{50}O_8$
C	584.34	$C_{34}H_{48}O_8$
D	598.35	$C_{35}H_{50}O_8$
E	612.3638	$C_{36}H_{52}O_8$
F	626.3807	$C_{37}H_{54}O_8$

經快速原子撞擊 ( FAB ) 之質譜分析，結果如下：

化合物	+ve FAB	-ve FAB	分子量
A	M/Z 635[M+Na] <sup>+</sup> M/Z 613[M+H] <sup>+</sup>	M/Z 611[M-H] <sup>-</sup>	612
B	M/Z 691[M+H+ 甘油] <sup>+</sup> M/Z 599[M+H] <sup>+</sup> M/Z 581[MH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> M/Z 563[MH-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>		598
C	M/Z 607[M+Na] <sup>+</sup>	M/Z 583[M-H] <sup>-</sup>	584
D	M/Z 621[M+Na] <sup>+</sup>	M/Z 597[M-H] <sup>-</sup>	598

化合物 E 之磁場解吸質譜分析結果 M/Z 612 M<sup>+</sup>，  
而化合物 F 則 M/Z 625 M<sup>+</sup>。

化合物 A 經精確質量測定之電子衝擊譜，指出離子在

：

612.37  $C_{36}H_{52}O_8$ ; 466.31  $C_{30}H_{42}O_4$ ; 448.30  $C_{30}H_{40}O_3$ ;  
 425.23  $C_{26}H_{33}O_5$ ; 354.22  $C_{23}H_{30}O_3$ ; 297.22  $C_{21}H_{29}O$ ;  
 278.11  $C_{15}H_{18}O_5$ ; 247.17  $C_{16}H_{23}O_2$ ; 219.18  $C_{15}H_{23}O$ ;  
 95.05  $C_6H_7O$ 。

化合物 B 之離子在：

598.35  $C_{35}H_{50}O_8$ ; 438.28  $C_{28}H_{38}O_4$ ; 420.26  $C_{28}H_{36}O_3$ ;

314.19  $C_{20}H_{26}O_3$ ; 248.14  $C_{15}H_{20}O_3$ ; 151.08  $C_9H_{11}O_2$ .

化合物 C 之離子在：

584.34  $C_{34}H_{48}O_8$ ; 566.33  $C_{34}H_{46}O_7$ ; 438.28  $C_{28}H_{38}O_4$ .

化合物 D 之離子在：

598.35  $C_{35}H_{50}O_8$ ; 452.29  $C_{29}H_{40}O_4$ ; 434.28  $C_{29}H_{38}O_3$ .

化合物 E 經離子衝擊離子化模式之精確質譜分析，顯示離子在 452.2908  $C_{29}H_{40}O_4$ ；

化合物 F 之離子在 466.3067  $C_{30}H_{24}O_4$ 。

(iii) 化合物 A, B, C, D, E 及 F 在溴仿中之紅外線光譜具有下列吸收峰：

化合物 A：約 3510 (OH), 1712 (酯) 及 998 厘米<sup>-1</sup>(C-O)；

化合物 B：約 3510 (OH), 1710 (酯) 及 996 厘米<sup>-1</sup>(C-O)；

化合物 C：約 3510 (OH), 1712 (酯) 及 996 厘米<sup>-1</sup>(C-O)；

化合物 D：約 3508 (OH), 1711 (酯) 及 996 厘米<sup>-1</sup>(C-O)；

化合物 E：約 3500 (OH), 1708 (酯) 及 994 厘米<sup>-1</sup>(C-O)；

化合物 F：約 3500 (OH), 1708 (酯) 及 997 厘米<sup>-1</sup>(C-O)；

附圖 1, 2, 3, 4, 6 及 7 分別為化合物 A, B, C, E 及 F 之全部紅外線光譜。

(iv) 化合物 A, B, C, D, E 及 F 在甲醇中 (c=0.002%) 之紫外線光譜如下 (表中 I 指轉折點, M 指最高峰)：

化合物	$\lambda$ (nm)	$E_1^1$	化合物	$\lambda$ (nm)	$E_1^1$
A	252 (I)	318	D	252 (I)	263
	244.5 (M)	468		244.5 (M)	393
	239 (I)	430		239 (I)	362
B	252 (I)	302	* E	252 (I)	266
	244.5 (M)	426		244 (M)	402
	239 (I)	394		238 (M)	373
C	252 (I)	316	* F	252 (I)	285
	244.5 (M)	470		244.5 (M)	421
	239 (I)	432		239 (M)	389

(\* 甲醇  $c = 0.001\%$ )

必要注意的是  $\lambda_{\max}$  為諸要素之特性， $E_1^1$  為所得物質純度之指標。 $E_1^1$  之比值為化合物本身之特性。

(V) 諸化合物在氘氯仿溶液中之  $200 \times 10^6$  赫質子核磁共振譜具有下列訊號〔在括弧中為  $\tau$  值和多重係數，偶合常數 Hz 及積分值〕之大約中心點：

化合物 A：4.1 至 4.4(m, 2H); 4.61(寬 s, 1H); 4.6 至 4.75(m, 2H); 4.81(d, 9, 1H); 5.05(m, 1H); 5.34(s, 2H); 5.69(d, 5, 1H); 6.06(d, 5, 1H); 6.17(m, 1H); 6.26(d, 11, 1H); 6.37(m, 1H); 6.46(d, 10, 1H); 6.74(q, 2, 1H); 7.42(m, 1H); 7.7 至 7.9(m, 5H); 8.14(s, 3H); 8.40(s, 3H); 8.47(s, 3H); 8.61(t, 11, 1H); 8.96(d, 7, 3H); 9.06(d, 7, 3H); 9.02(d, 7, 3H); 9.13(q, 11, 1H); 9.21(d, 7, 3H)。

化合物 B : 4.2 至 4.4(m,2H); 4.55(q,7,1H); 4.65( 寬 ,s,1H); 4.6 至 4.8(m,2H); 5.06(m,1H); 5.3 5.5(m,2H); 6.01(d,5,1H); 6.07(d,5,1H); 6.12(s,1H); 6.24(d,11,1H); 6.24(m,1H); 6.3 至 6.5(m,2H); 6.53(s,3H); 6.73(q,2,1H); 7.62(m,1H); 7.6-8.0(m,4H); 8.22(s,3H); 8.35(d,7,3H); 8.41(s,3H); 8.49(s,3H); 8.62(t,11,1H); 9.03(d,6,3H); 9.12(q,11,1H); 9.22(d,7,3H).

化合物 C : 4.29(d,11,t,2,1H); 4.4 至 4.6(m,3H); 4.56( 寬 s,1H); 5.14(dd,15,10,1H); 5.23(m,1H); 5.65( 寬 s,2H); 5.72(d,6,1H); 5.95(d,10,1H); 5.99(d,6,1H); 6.08( 寬 s,1H); 6.1 至 6.4(m,3H); 6.62(q,3,1H); 7.7 至 8.1(m,ca7H); 8.18(s,3H); 8.33(s,3H); 8.48(d,7,3H); 8.64(s,3H); 8.68(t,11,1H); 9.00(d,7,3H); 9.08(d,7,3H); 9.12(q,12,1H).

化合物 D : 4.18 至 4.4 (m,2H); 4.47 至 4.81 (m,4H); 5.04 (m,1H); 5.35 (s,2H); 5.72 (d,7,1H); 6.07 (d,7,1H); 6.15 至 6.45 (m,4H); 6.74 (q,4,1H); 7.45 - 8.1 (m,8H); 8.16 (s,3H); 8.41 (s,3H); 8.49 (s,3H); 8.62 (t,11,1H); 8.92 - 9.05 (m,6H); 9.21 (d,7,3H).

化合物 E: 4.1 至 4.3 (m,2H); 4.5 至 4.8 (m,4H 全部 ); 5.04 (m,1H); 5.2 5.5 (m,2H); 6.01 (d,5,1H); 6.05 (d,5,1H); 6.11 (s,1H); 6.1 至 6.4 (m,3H); 6.45 (d,10,1H); 6.51 (s,3H); 6.70 (q,2,1H); 7.60 (m,1H); 8.20 (s,3H); 8.41 (s,3H); 8.47 (s,3H); 8.60 (t,11,1H); 9.00 (t,7,3H); 9.02 (d,6,3H); 9.11 (q,11,1H); 9.20 (d,7,3H).

化合物 F: 4.2 至 4.4 (m,2H); 4.62 (s,1H); ca 4.70 (m,2H); 4.80 (d,9,1H); 5.04 (m,1H); 5.2 至 5.5 (m,2H); 5.99 (d,5,1H); 6.05 (d,5,1H); 6.11 (s,1H); 6.1 至 6.3 (m,2H); ca 6.36 (m,1H); 6.45 (d,10,1H); 6.51 (s,3H); 6.70 (q,2,1H); 7.42 (m,1H); 7.58 (m,1H); 8.19 (s,3H); 8.40 (s,3H); 8.47 (s,3H); 8.60 (t,11,1H); 8.95 (d,7,3H); 9.05 (d,7,3H); 9.01 (d,7,3H); 9.10 (q,11,1H); 9.21 (d,6,3H).



(vi) 諸化合物在氘氣仿中之溶液之雜音解雙  $25.05 \times 10^6$  赫碳-13核磁共振譜之吸收峰大於位置如下 [在括弧內為  $\delta$  值及非共振譜之多重訊號] :

化合物 A: 173.2(s); 142.6(d); 139.2(s); 137.6(s); 137.1(s);  
137.0(d); 130.4(s); 123.1(d); 120.1(d); 117.8(d); 99.5(s); 80.0(s);  
79.0(d); 76.5(d); 69.0(d); 68.3\*; 67.4(d); 48.2(t); 45.5(d); 40.9(t);  
40.5(t); 35.8\*; 34.5(t); 22.1(q); 34.5(t); 26.6(d); 22.6(q); 22.0(q);  
19.7(q); 15.3(q); 13.7(q); 10.8(q).

化合物 B: 173.4(s); 142.1(d); 139.5(s); 137.1(s); 135.7(s);  
133.7(s); 123.6(d); 123.3(d); 120.0(d); 119.3(d); 118.2(d); 99.5(s);  
80.1(s); 77.3(d); 76.6(d); 76.4(d); 69.0(d); 68.3(d); 67.9 \*; 67.6  
\*; 57.5(q); 48.2(t); 45.4(d); 40.7(t); 40.5(t); 35.8\*; 34.5(t); 22.1(q);  
19.6(q); 15.3(q); 13.6(q); 12.9(q); 10.5(q).

化合物 C: 173.3(s); 142.2(d); 140.3(s); 138.5(s); 137.0(s);  
134.9(s); 123.9(d); 121.1(d); 120.6(d); 118.1(d); 100.2(s); 80.6(s);  
80.1(d); 77.4(d); 69.2(d); 69.0(d); 68.3 \*; 68.0(d); 67.9(d); 48.6(t);  
46.3(d); 41.4(t); 36.5 \*; 36.3 \*; 36.1(d); 35.0(t); 22.6(q); 20.0(q);  
15.4(q); 14.3(q); 13.1(q); 10.8(q).

化合物 D: 173.2 (s); 142.5 (d); 139.1 (s); 137.5 (s); 137.1 (s);  
132.1 (s); 131.4 (d); 123.1 (d); 120.1 (d); 117.8 (d); 99.5 (s); 79.9  
(s); 79.2 (d); 76.5 (d); 69.0 (d); 68.3\*; 68.1\*; 67.6\*; 67.4 \*; 48.2  
(t); 45.5 (d); 40.8 (t); 40.5 (t); 35.7 \*; 34.5 (t); 22.0 (q); 20.6 (t); 19.6  
(q); 15.3q; 13.7 (q); 13.6 (q); 10.7 (q).

\* 多重性未確定

(vii) 圖 8 顯示化合物 A, B, C 及 D 在甲醇中約 0.1% 之溶液之圓形兩向色性曲線。此等曲線在 230 至  $260 \times 10^{-9}$  米波長範圍很接近, 相當於二烯發色團之解吸。表示此四種化合物在  $C_2$ ,  $C_7$ ,  $C_{17}$  及  $C_{19}$  絕對構型相同。

#### 實施例 10

I 對不同動物體之各種外寄生蟲及內寄生蟲之抵抗活性。

##### (1) 牛：

令小牛感染奧斯特胃蟲 ( *Ostertagia ostertagi* ) 之幼蟲。於感染後 23 天, 服用 ( 口服 ) 本發明之化合物, 其藥劑量為  $200 \mu\text{g} / \text{kg}$ 。於感染後 29 天將這些小牛宰殺, 並計算所感染的蟲數。

試驗結果證明, 化合物 A, C, D 完全消滅了奧斯特胃蟲, 而化合物 B 具有 63 % 之殺死率。

依上述相似之試驗步驟, 而採用的單一藥劑量為  $800 \mu\text{g} / \text{Kg}$  時, 化合物 A 顯示完全消滅了古巴毛樣線蟲 ( *Cooperia oncophora* ) 。

##### (2) 羊

使羊感染奧斯特胃蟲之幼蟲。於感染後 21 天, 以本發明之化合物加以處理, 其單一藥劑量為  $200 \mu\text{g} / \text{Kg}$ 。於感染後 27 天, 將這些動物宰殺, 並計算所感染之蟲數。

試驗結果顯示化合物 A, D 完全消滅了奧斯特胃蟲, 而化合物 C 具有 74 % 之殺死率。

依相似的方法, 將單一劑量為  $200 \mu\text{g} / \text{Kg}$  之化合物 A 處理 ( 口服 ) 受感染的羊, 結果顯示完全消滅了反芻獸胃

蟲 ( *Haemonchus contortus* ) , 環狀奧斯特胃蟲 ( *Ostertagia circumcincta* ) , 毛狀圓蟲 ( *Trichostrongylus colubriformis* ) , 及細頭毛樣線蟲 ( *Nematodirus spathiger* ) 。

### (3) 猪

將 1200  $\mu\text{g}$  / Kg 劑量之化合物 A , 施行皮下注射 , 結果顯示該劑量足夠使受疥蟲 ( *Sarcoptes scabiei* ) 之幼蟲感染之猪完全治癒。

### II 在玻璃體中對扁蟲 ( Tick ) 之抵抗活性

在接觸試驗中 , 化合物 B 顯示於 24 - 48 小時內 , 可將牛壁蝨 ( *Rhipicephalus appendiculatus* ) 之成蟲完全消滅。

### III 對植物害蟲之抵抗活性

依據中文說明書第 44 頁末段“乳化濃體”之配方調製。其活性顯示：

化合物 A , C 對小蟲 ( *Tetranychus urticae* ) ( 法國蠶豆 ) 蚜蟲 ( *Myzus persicae* ) ( 大白菜 ) 、螟蛉 ( *Heliothis virescens* ) ( 棉花 ) 及螟蟲 ( *Chilo portellus* ) ( 雷普菜豆 ) ( Rape bean ) , 三天後之活性為 80 - 100 % 效益。對根瘤線蟲 ( *Meloidogyne incognita* ) ( 芒菜豆 ) , 七天後之活性為 80 - 100 % 之效益。

化合物 B 對小蟲、螟蛉及螟蟲 , 三天後效益為 80 - 100 % 。

### IV 對老鼠之毒性試驗

利用腹膜內 ( I.P ) 及口服 ( P.O ) 二種方式 , 來評估對老鼠的劇毒試驗。經過 21 天之觀察並測得  $\text{LD}_{50}$  。

將試驗之化合物溶於丙二醇 , 將 0.1 毫升的溶液滴入母

老鼠之腹膜內。而口服之方式，則服用 0.2 毫升的丙二醇。

依  $LD_{50}$  之表示法，即殺死 50 % 老鼠所需要之藥劑量（每公斤老鼠所需試驗化合物之毫克數），試驗結果如下所示：

化合物	方 式	$LD_{50}$ (mg/Kg)
A	I.P.	12.5-50
B	I.P.	400
C	I.P.	25-50
D	I.P.	25-50
Ivermectin		12.5-50

化合物	方 式	$LD_{50}$ (mg/kg)
A	P.O	100-200
B	P.O	> 200
C	P.O	> 200
D	P.O	100-200
Ivermectin	S.C.*	> 50

\* S.C 為皮下注射。

由上表顯示化合物 A，C，D 與 Ivermectin 之毒性相差不多，而化合物 B 顯然地具較低之毒性。

以下乃本發明之配方例。例中之活性成分乃指本發明化合物，例如是化合物 A，B，C，D，E 或 F。

多劑量腸外注射劑

	<u>%重量/體積</u>	<u>範圍</u>
活性成分	4.0	1-5% 重量/體積
甘油	2.0	
甘油三醋酸酯	30.0	
丙二醇，加至	100.0	

使活性成分溶於甘油及甘油三醋酸酯，加入丙二醇，使體積變成 100 份。過濾溶液以移除任何顆粒雜質。在無菌條件下裝於注射管瓶中，以橡皮塞密封或外加鋁製封環。最後在壓熱釜中殺菌。

噴霧劑

	<u>%重量/重量</u>	<u>範圍</u>
活性成分	0.1	0.01-0.50 % 重量/重量
三氯乙烷	29.9	
三氯氟甲烷	35.0	
二氯二氟甲烷	35.0	

使活性成分和三氯乙烷混合，裝入噴霧容器中，以氣相推進劑沖掃容器內部上方的空間。裝上閥。經閥通入所

欲重量之液態推進劑。裝起動器及防塵蓋。

### 錠片

製法：（濕粒法）

	<u>%重量/重量</u>	<u>毫克</u>
活性成分		250.0
硬脂酸鎂	1	4.5
玉米粉	5	22.5
澱粉乙醇酸鈉	2	9.0
月桂基硫酸鈉	1	4.5
微晶纖維素		159.5
		<hr/> 450

（錠片核心全重）

在活性成分中加入足量的 10 % 澱粉糊（漿糊）以得適於顆粒化之濕質體。形成顆粒，利用盤子或流化床乾燥器乾燥之。篩析，加入其餘成分，壓成錠片。

必要時，以羥丙基纖維素或其他類似的成膜物質利用水性或非水性溶劑系統配成塗膜溶液塗覆錠片核心。塗膜溶液中尚可加入助塑劑及合適的着色劑。

### 寵物及家畜用錠片

製法：（乾粒法）

	<u>毫克</u>
活性成分	50.0
硬脂酸鎂	7.5
微晶纖維素	17.5
	<hr/> 75.0

使活性成分和硬脂酸鎂及微晶纖維素混合，壓成小塊。  
。使此等小塊通過迴轉顆粒機而碎化成自由流動之顆粒，  
再壓製成錠片。

必要時，如前述以塗膜溶液被覆此等錠片核心。

#### 獸用乳房內注射劑

	<u>%重量/重量</u>	<u>毫克/劑量</u>	<u>範圍</u>
活性成分		150	150-500 毫克
聚山梨酸 60	3.0		至 3 或 5 克
白蜂蠟	6.0	至 3 克	至 3 或 5 克
花生油	91.0		至 3 或 5 克

攪拌，加熱花生油，白蜂蠟及聚山梨酸 60 至 160 °C。  
保持在 160 °C，2 小時後攪拌冷卻至室溫。在無菌條件下，  
於携體中加入活性成分，以高速攪拌器分散之。以膠體磨  
研細。在無菌條件下，將所得產物裝入消毒過之塑膠注射  
筒中。

#### 獸用口服藥水

	<u>%重量/體積</u>	<u>範圍</u>
活性成分	0.35	0.05-0.50 % 重量/體積
聚山梨酸 85	5.0	
苯醇	3.0	
丙二醇	30.0	
磷酸鹽緩衝液	(使 pH 6.0-6.5 )	
水，加至	100	

使活性成分溶於聚山梨酸 85，苧醇及丙二醇。加入一部份水，必要時以磷酸鹽緩衝液調 6.0-6.5。加水至最後的體積，裝入獸用藥水容器中。

#### 獸用口服糊劑

	<u>%重量/重量</u>	<u>範圍</u>
活性成分	7.5	1 - 10 %重量/重量
糖精	25.0	
聚山梨酸 85	3.0	
二硬脂酸鋁	5.0	
分餾過之椰子油，加至	100	

加熱，使二硬脂酸鋁分散於分餾過之椰子油及聚山梨酸 85。冷卻至室溫，使糖精分散於此油態携體中。最後使活性成分分散於基體中，裝入在塑膠注射筒中。

#### 獸用摻在飼料中之顆粒

	<u>%重量/重量</u>	<u>範圍</u>
活性成分	2.5	0.05-5 % 重量/重量
石灰石粉，加至	100.0	

使活性成分和石灰石粉混合。以濕粒法製造顆粒，在盤中或流化床乾燥器中乾燥。裝入適當的容器中。

#### 乳化濃體

活性成分	50
陰離子乳化劑（如磺酸苯酯 "CALX"）	40
非離子乳化劑（如 Syperonic <sup>®</sup> NP13）	60
芳族溶劑（如 Solvesso <sup>®</sup> 100）加至	1



混合所有成分，攪拌，直到溶解。

顆粒

(a) 活性成分	50
木松香	40
石膏粒 (20-60 目, Agsorb <sup>(R)</sup> 100A ), 加至	1
(b) 活性成分	50
非離子乳化劑 (Syperonic <sup>(R)</sup> NP13 )	40
石膏粒 (20 - 60 目), 加至	1

使所有成分溶解在揮發性溶劑，如二氯甲烷中，加入顆粒翻滾混合器中。乾燥以除去溶劑。

以下列害蟲及宿主試驗化合物 A, B, C, D, E 及 F 之活性：小蟲 [法國蠶豆及麥羅巴蘭 B 李樹]，蚜蟲 [大白菜及蘿蔔]，螟蛉 [棉花]，螟蟲 [雷普菜豆]，根瘤線蟲 [芒菜豆]，紅蜘蛛 [麥羅巴蘭 B 李樹]，蚤蠅 [忽布]，瓜葉蟲 [櫻草]。

使產物依液態製劑形式使用，亦即使產物溶於丙酮中。然後以含有 0.1 或 0.01% 重量之潤濕劑之水稀釋，直到液態製劑中含有所欲產物之濃度。

試驗時，使數隻害蟲寄生在宿主上，而以製劑處理宿主（殘餘保護試驗）。在小蟲之場合下，宿主及害蟲均以製劑處理（接觸試驗）。

結果顯示化合物 A 至 F 在 500 ppm (百萬份中之份數) 或以下之濃度有殺蟲之效果。

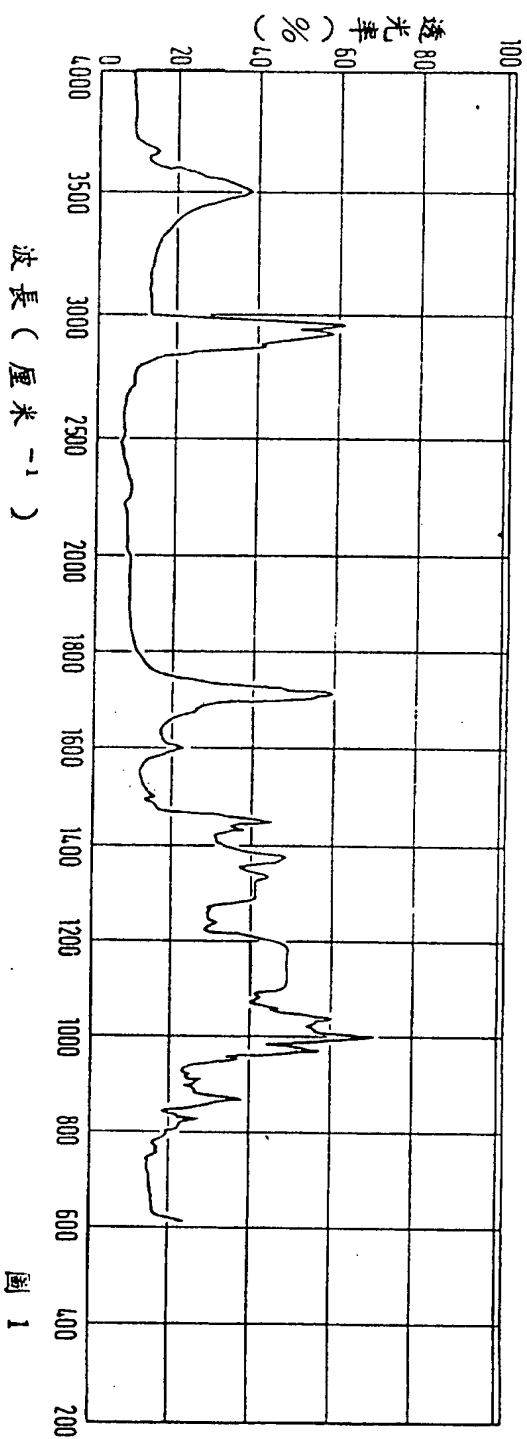


圖 1

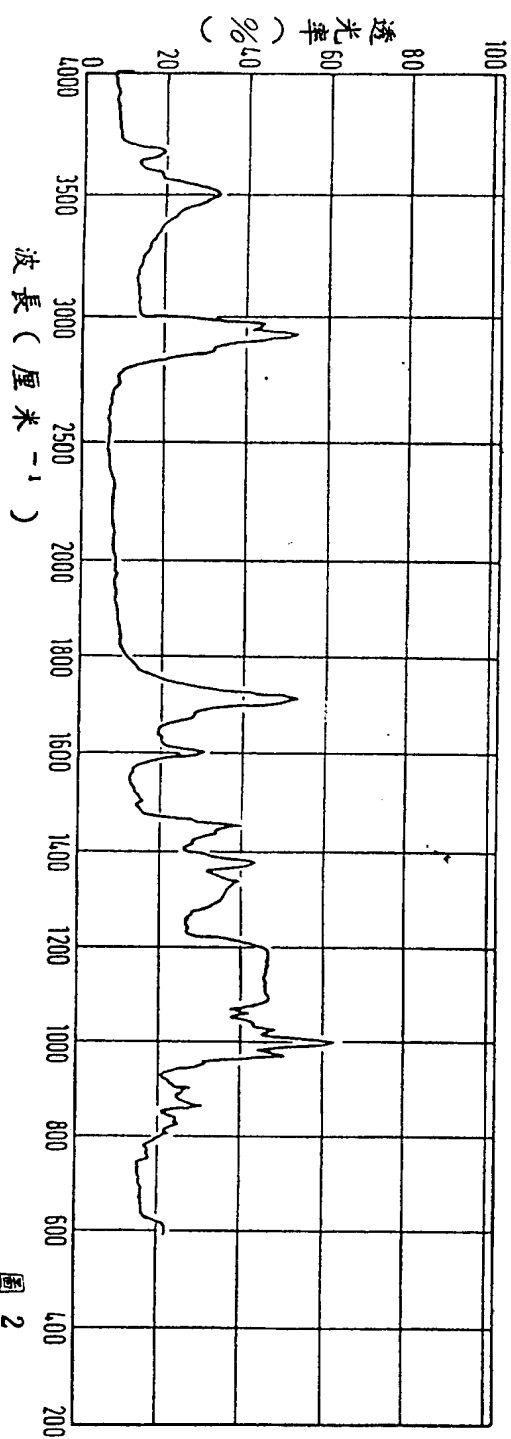


圖 2

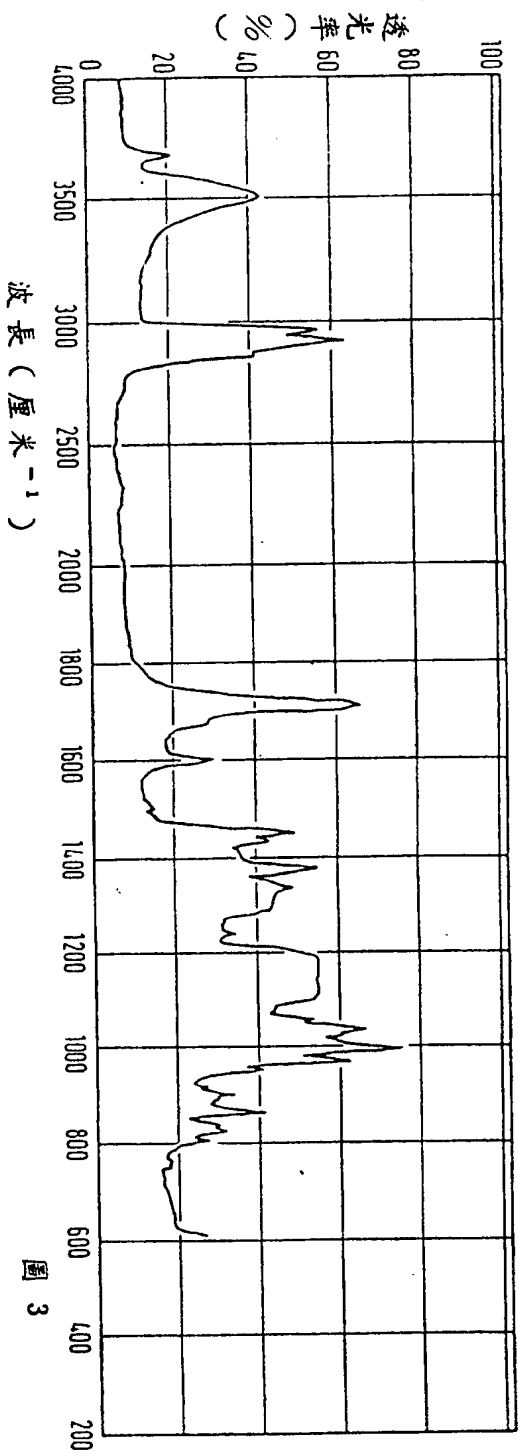


圖 3

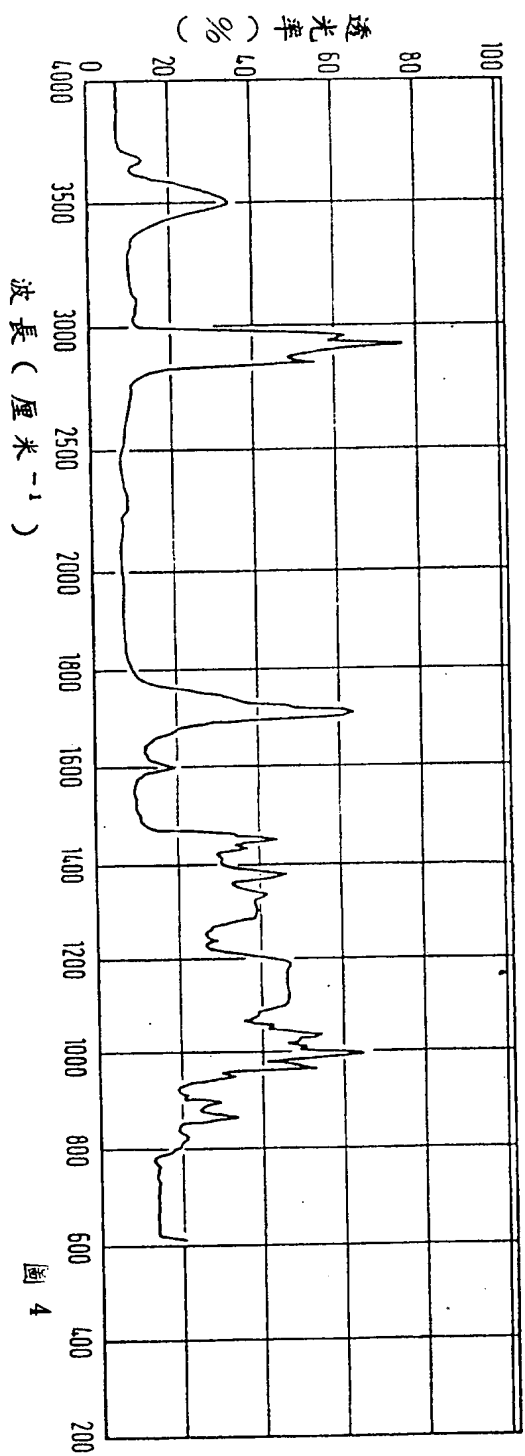
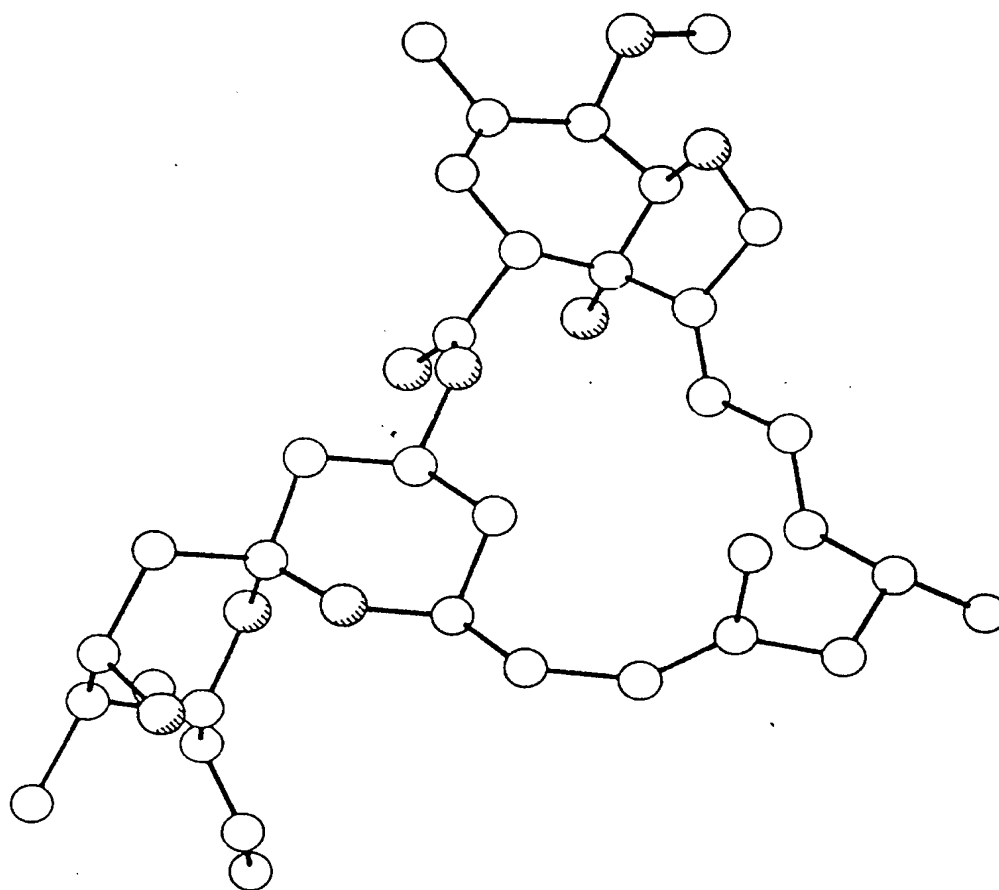


圖 4

圖 5



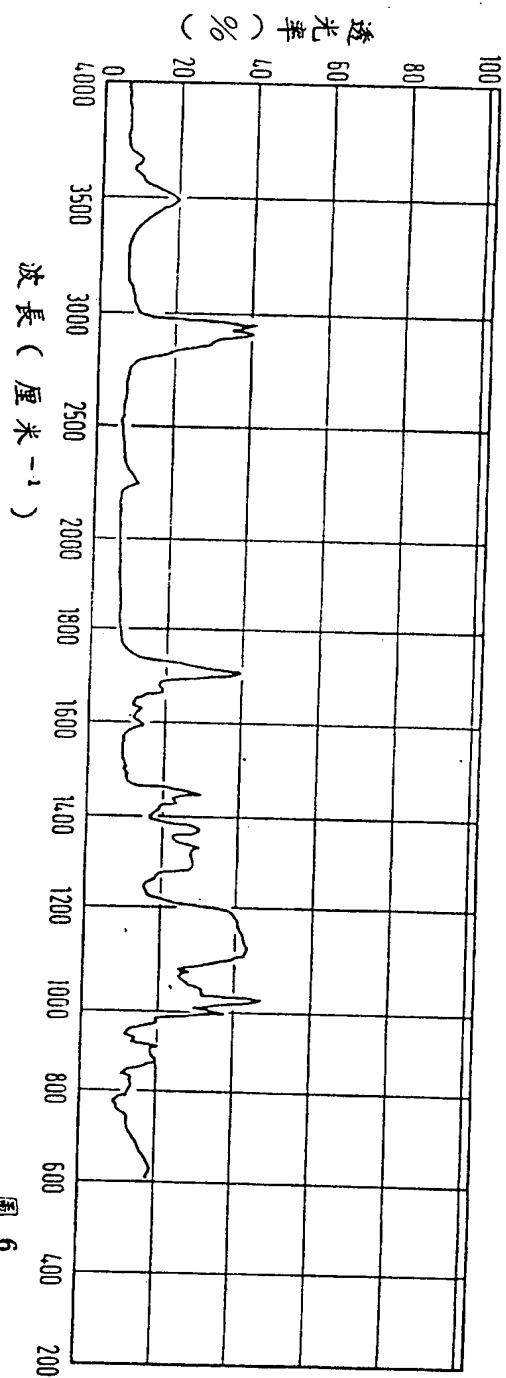


圖 6

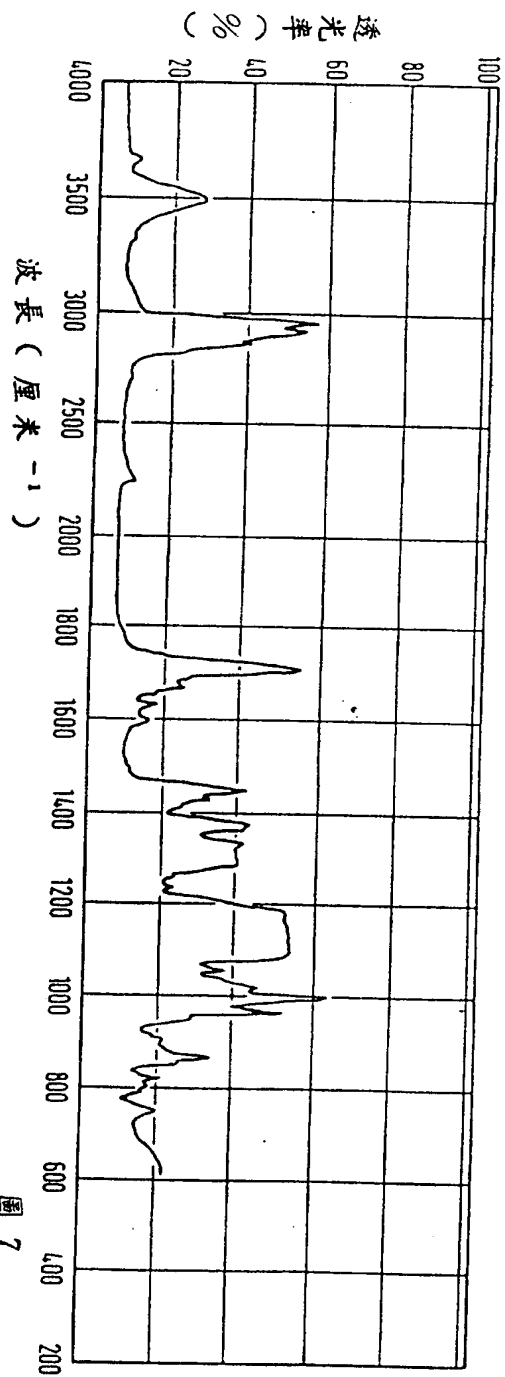


圖 7

129660

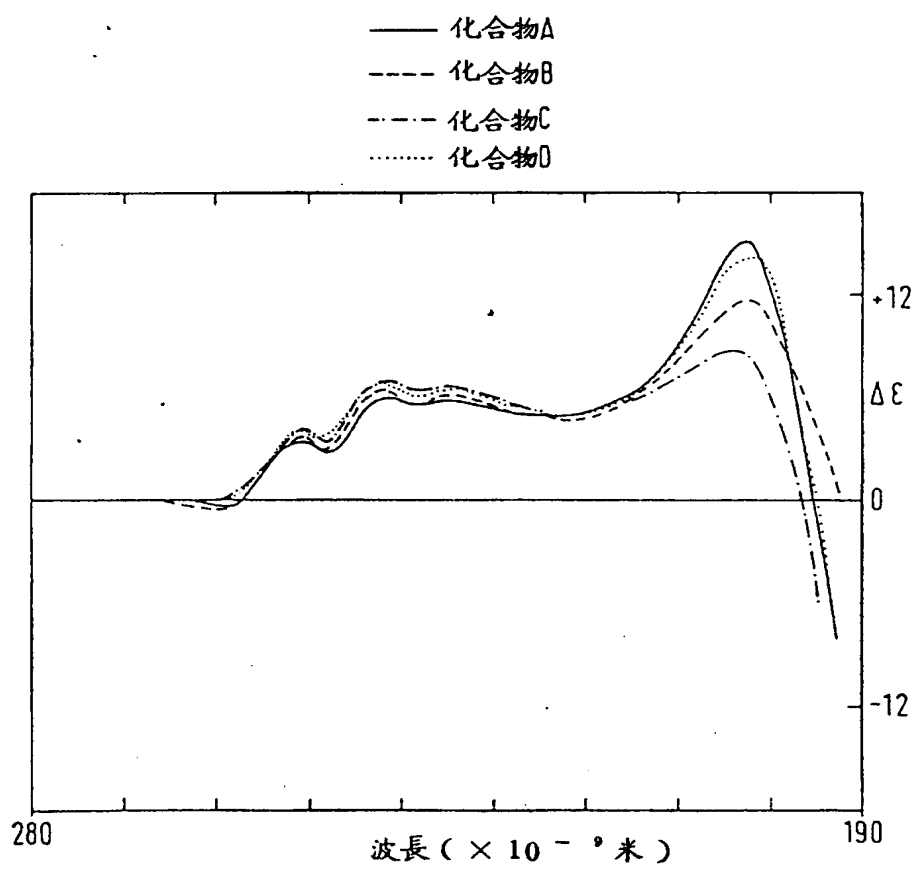


圖 8

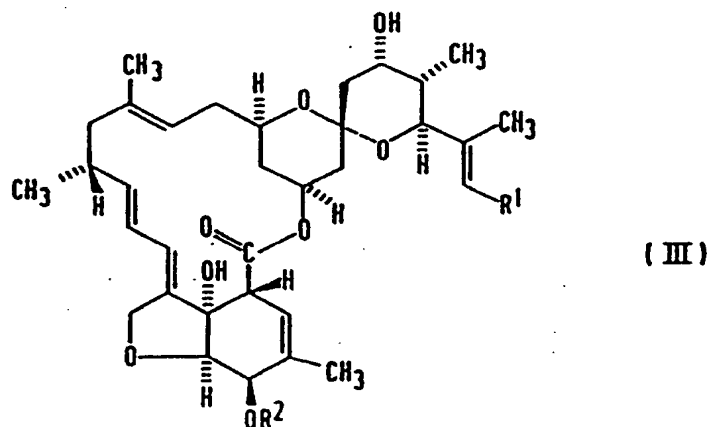
第 74104057 號「巨環內酯化合物 (Macrolide compound)

及其製法」專利案

78年12月修正  
年 月 日

申請專利範圍：

1 式 (III) 化合物之製法：



式中  $R^1$  係甲基，乙基或異丙基， $R^2$  係氫或甲基；其係包含在 20 - 50 °C 之溫度及 pH 5.5-8.5 下培養鏈黴菌屬微生物（例如熱築鏈黴菌屬，如熱築鏈黴菌 NCIB 12015 或其變異株）2 - 10 天，由此生成至少一種式 ( III ) 之化合物，如有需要時隨即從所生成之醱酵混合液，例如以溶劑萃取法（所使用有機溶劑如酮，烴，鹵化烴，醇，二醇或酯溶劑）將至少一種式 ( III ) 化合物加以抽取分離。

2 根據申請專利範圍第 1 項之製法，式中  $R^1$  係異丙基， $R^2$  係氫。

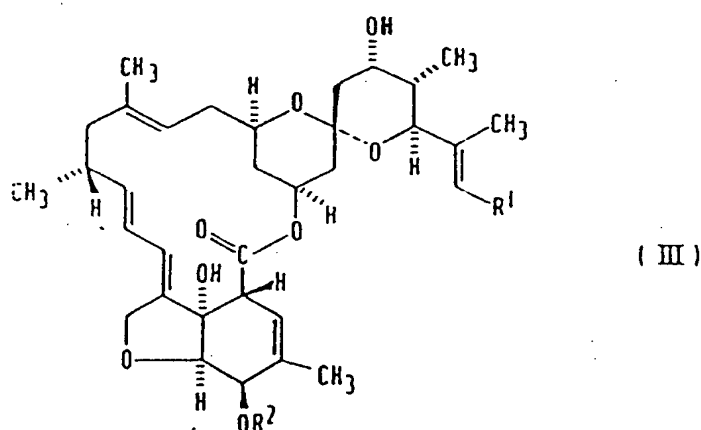
3 根據申請專利範圍第 1 項之製法，式中  $R^1$  係甲基， $R^2$  係氫。

4. 根據申請專利範圍第 1 項之製法，其中使微生物之菌絲和水相溶之溶劑接觸，以萃取出一種或多種第 1 項之化合物。

5. 根據申請專利範圍第 1 項之製法，所得之式 (III) 化合物實質上呈純製之形式，或實質上不含有其他巨環內酯化合物。

6. 根據申請專利範圍第 1 項之製法，所得產物為申請專利範圍第 1 項所述之化合物混合體，或式中  $R^2$  為氫之申請專利範圍第 1 項化合物之混合體，或式中  $R^2$  為甲基之申請專利範圍第 1 項化合物之混合體。

7. 具有通式 III 結構之化合物



式中  $R^1$  係甲基，乙基或異丙基， $R^2$  係氫或甲基。

8. 根據申請專利範圍第 7 項化合物，式中  $R^1$  係異丙基， $R^2$  係氫。

9. 根據申請專利範圍第 7 項化合物，其中  $R^1$  為甲基及  $R^2$  為氫。

10. 根據申請專利範圍第 7, 8 或第 9 項之化合物，其係實質上不含有其他巨環內酯化合物者。



11. 根據申請專利範圍第 7, 8 或第 9 項之化合物, 其係實質上呈純製之形式者。
12. 一種如申請專利範圍第 7, 8 或 9 項之化合物, 和該項之其他化合物至少之一相混合之者; 或和  $R^2$  為氫之如申請專利範圍第 7 項化合物相混合之者; 或和  $R^2$  為甲基之如申請專利範圍第 7 項化合物相混合之者。
13. 一種在治療人類或動物中當做抗生素使用之如申請專利範圍第 7 項化合物。
14. 可用來撲滅例如在農業, 園藝或森林害蟲之組成物, 其含有效量的如申請專利範圍第 7 項化合物之至少一種和一種或多種載體及 / 或賦形劑者, 其中, 上述害蟲尤其指果實端及蚜類, 如蚜蟲, 瓜葉蟲, 桃蚜, 浮塵子, 辛氏蟲, 褐飛蟲, 紅蜘蛛, 蚤蠅, 銹蟎, 小蟲及果蠅屬; 線蟲, 如葉芽線蟲, 球線蟲, 異根瘤線蟲, 根瘤線蟲及龐納氏線蟲; 鱗翅類, 如螟蛉, 小菜蛾及龐納氏線蟲; 蛾類象鼻蟲, 如安松氏穀象及席托氏穀象; 麵粉甲蟲, 如擬穀盜蟲; 蒼蠅如家蠅; 螢蟻; 鑽葉蟲; 梨蟲; 蔥薊馬; 蟬螂, 如小野蟬螂及蜚蠊, 以及蚊子, 如熱帶編紋。
15. 根據申請專利範圍第 14 項之組成物, 其含有如申請專利範圍第 7 項化合物任意和一種或多種表面活性劑, 抗塊劑, 消泡劑, 黏着調節劑, 黏着劑, 肥料, 穩定劑或其他添加劑或活性成分者。
16. 使用在人類醫藥之組成物, 其含有效量之如申請專利範圍第 7 項化合物之至少一種和一種或多種載體及 / 或賦形劑者。

17 使用在獸醫藥之組成物，其含有效量之如申請專利範圍第7項化合物之至少一種和一種或多種載體及/或賦形劑者。

18 使用在獸醫藥中之如申請專利範圍第17項之組成物，其含純度至少50%之一種或多種如申請專利範圍第7項化合物，及均適合以非經腸（包括乳房內），口服，直腸，局部或移植方式使用。

19 根據申請專利範圍第14，15，16，17或第18項之組成物，其含有主要由一種或多種申請專利範圍第7項化合物組成的活性化合物之混合體。

裝

訂

線

12 f 660

中華民國八十年一月一日

中華民國專利公報

更正

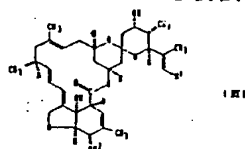
(專利法第五十六條第二項，第一百十條準用第五十六條第二項，第一百二十二條第二項)

專利申請案號	原公告日期	專利權證字號	專 利 權 人	專 利 名 稱
74104057	79.03.01	發明38790	英商．格拉斯哥集團有限公司	巨環內酯化合物 (Macrolide compound) 及其製法

申請專利範圍：

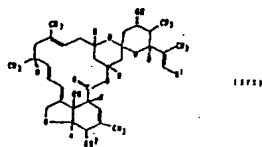
更正事項：

1. 式 (Ⅲ) 化合物之製法：



式中  $R^1$  係甲基，乙基或異丙基， $R^2$  係氫或甲基；其係包含在  $20 \sim 50^\circ\text{C}$  之溫度及  $\text{pH} 5.5 \sim 8.5$  下培養熱築鏈黴菌屬（如熱築鏈黴菌 NCIB 12015 或其變異株）2～10 天，由此生成至少一種式 (Ⅲ) 之化合物，如有需要時隨即從所生成之醱酵混合液，例如以溶劑萃取法（所使用有機溶劑如酮，烴，鹵化烴，醇，二醇或酯溶劑）將至少一種式 (Ⅲ) 化合物加以抽取分離。

- 根據申請專利範圍第 1 項之製法，式中  $R^1$  係異丙基， $R^2$  係氫。
- 根據申請專利範圍第 1 項之製法，式中  $R^1$  係甲基， $R^2$  係氫。
- 根據申請專利範圍第 1 項之製法，其中使微生物之菌絲和水相溶之溶劑接觸，以萃取出一種或多種第 1 項之化合物。
- 根據申請專利範圍第 1 項之製法，所得之式 (Ⅲ) 化合物實質上呈純製之形式，或實質上不含有其他巨環內酯化合物。
- 根據申請專利範圍第 1 項之製法，所得產物為申請專利範圍第 1 項所述之化合物混合體，或式中  $R^2$  為氫之申請專利範圍第 1 項化合物之混合體，或式中  $R^2$  為甲基之申請專利範圍第 1 項化合物之混合體。
- 具有通式 Ⅲ 結構之化合物



式中 $R^1$ 係乙基而 $R^2$ 係甲基。

8. 根據申請專利範圍第7項之化合物，其係實質上不含有其他巨環內酯化合物者。
9. 根據申請專利範圍第7項之化合物，其係實質上呈純製之形式者。
10. 一種在治療人類或動物當做抗生素使用之如申請專利範圍第7項化合物。
11. 可用來撲滅例如在農業，園藝或森林害蟲之組成物，其含有有效量的如申請專利範圍第7項化合物之至少一種或和一種或多種載體及／或賦形劑者，其中，上述害蟲尤其指果實蠹及蚜類如蚜蟲，瓜葉蟲，桃蚜，浮塵子，辛氏蟲，褐飛蟲，紅蜘蛛，蚤蠅，銹蟎，小蠹及果蠅屬；線蟲，如葉芽線蟲，球線蟲，異根瘤線蟲，根瘤線蟲及龐納氏線蟲；鱗翅類，如螟蛉，小菜蛾及龐納氏線蟲；殼類象鼻蟲，如安松氏殼象及席托氏殼象；麵粉甲蟲，如擬設盜蟲；蒼蠅如家蠅；蜚蠊；鑽葉蟲；梨蟲；蔥薊馬；蟑螂，如小野蟑螂及蜚蠊，以及蚊子，如熱帶稿紋。
12. 根據申請專利範圍第11項之組成物，其含有如申請專利範圍第7項化合物任意和一種或多種表面活性劑，抗塊劑，消泡劑，黏著調節劑，黏著劑，肥料，穩定劑或其他添加劑或活性成分者。
13. 使用在人類醫藥之組成物，其含有有效量之如申請專利範圍第7項化合物之至少一種和一種或多種載體及／或賦形劑者。
14. 使用在獸醫學之組成物，其含有有效量之如申請專利範圍第7項化合物之至少一種和一種或多種載體及／或賦形劑者。
15. 使用在獸醫藥中之如申請專利範圍第14項之組成物，其含純度至少50%之一種或多種如申請專利範圍第7項化合物，及均適合以非經腸（包括乳房內），口服，直腸，局部或移植方式使用。
16. 根據申請專利範圍第11，12，13，14或第15項之組成物，其含有主要由一種或多種申請專利範圍第7項化合物組成的活性化合物之混合體。